

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



IMPLICACIÓN DE LOS EXOSOMAS EN LA REACCIÓN ALÉRGICA:
PORTADORES DE AEROALÉRGENOS Y VACUNAS

TESIS DOCTORAL:
ALBA NOELIA PRADO VÁZQUEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
EVA BATANERO CREMADES

Madrid, 2013

Portada: Micrografía electrónica de transmisión de exosomas derivados del lavado broncoalveolar de ratones *naïve*.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**IMPLICACIÓN DE LOS EXOSOMAS EN LA
REACCIÓN ALÉRGICA:
PORTADORES DE AEROALÉRGENOS Y VACUNAS**

TESIS DOCTORAL

ALBA NOELIA PRADO VÁZQUEZ

Madrid, 2013

Vº Bº Directora de la tesis:

Dra. Eva Batanero Cremades

A mis padres y mi hermano...
...por vuestro cariño y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Llegado el momento de finalizar esta tesis querría expresar mi agradecimiento a Pepe por haberme permitido formar parte de esta gran familia que es el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I. A Rosalía y a Mayte, por hacerme un hueco en el L-1, así como por su confianza durante todos estos años. También, agradecer a Paco el soporte técnico cada vez que he tenido "problemillas" con la ultra.

Gracias Eva, por todas las cosas que me has enseñado, tanto en el plano personal, como profesional y por la paciencia que has demostrado durante el transcurso de esta tesis.

A todos mis compañeros del L-1, por los buenos momentos científicos y por vuestra ayuda siempre que la he necesitado. Lourdes, Sofía y Óscar, los recuerdos que me llevo de vosotros son inolvidables y me considero afortunada por contar con vuestra amistad.

Gracias a todos los componentes del L-3 y L-13. En especial a Lucía, por las tertulias científicas y no tan científicas.

Quisiera expresar también mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han colaborado en este trabajo: Dr. Juan de Dios Alché, Dra. Marta Cañamero, Dra. Clotilde Théry, Dr. Juan Casado-Vela, Dr. Jorge Alegre-Cebollada, Dr. Héctor Fernández, Dra. M^a Luisa Sanz, Dra. Concepción De Linares, Dr. Pedro Gamboa, Dr. Rodrigo Barderas, Dr. Carlos Ardavín, Dra. Pilar Domínguez, Dr. Rafael I. Monsalve y Dr. Agustín Fernández.

A mis amigos Nagore, Marcos, Ana, Cristina, Javi, Pikika y Alberto por tener siempre una palabra de aliento cuando parece que todo va mal. Prometo devolveros toda la atención que esta tesis os ha robado. ¡Sois los mejores!

A toda mi familia le dedico mi más sincero agradecimiento, especialmente a mis abuelas Asunción y María, por hacerme sentir siempre tan querida, y a mis abuelos, que seguramente les hubiese gustado ver la finalización de este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres todo el apoyo y los esfuerzos que han hecho para que mi hermano y yo tuviésemos la oportunidad de aprender y hacer lo que siempre nos ha gustado. ¡No puedo haber tenido un mejor modelo en mi vida! David, gracias por estar siempre que te he necesitado. Sin vosotros, yo no hubiera llegado hasta aquí.

ÍNDICE

SUMMARY	VII
----------------	------------

INTRODUCCIÓN

LA REACCIÓN ALÉRGICA	1
MECANISMO DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS	3
Fase de sensibilización y desarrollo de memoria celular	3
Fase efectora	5
<i>Respuesta inmediata</i>	5
<i>Respuesta tardía</i>	5
ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS	6
Evitación del alérgeno	6
Farmacoterapia	7
Inmunoterapia específica	7
Nuevas estrategias para la alergia	11
<i>Vacunas activas</i>	12
<i>Inducción de tolerancia vía mucosas</i>	12
LOS EXOSOMAS, DE SISTEMA DE COMUNICACIÓN CELULAR A VACUNA	16
PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS EXOSOMAS	17
BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS	19
COMPOSICIÓN MOLECULAR	22
FUNCIONES DE LOS EXOSOMAS EN EL SISTEMA INMUNE	24
Funciones de los exosomas <i>in vitro</i>	24
Funciones de los exosomas <i>in vivo</i>	25
OTRAS FUNCIONES	27
LOS EXOSOMAS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS	27
EL POLEN DE OLIVO COMO MODELO EXPERIMENTAL	28
EL GRANO DE POLEN DE OLIVO	29
LA ALERGIA AL POLEN DE OLIVO	30
ALÉRGENOS DEL POLEN DE OLIVO	31
Ole e 1, ALÉRGENO PRINCIPAL DEL POLEN DE OLIVO	32

<u>OBJETIVOS</u>	35
-------------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

BLOQUE I. EXOSOMAS TOLEROGÉNICOS DERIVADOS DEL BALF COMO POSIBLE VACUNA NASAL PARA LA ALERGIA	37
MATERIALES	37
Animales	37
Fármacos para anestesia y eutanasia	37
Proteínas	37
Soluciones de uso general	37

Soluciones empleadas para los ensayos con esplenocitos	38
I.I AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DEL BALF	38
MÉTODOS	38
Inducción de tolerancia	38
Sensibilización alérgica	39
Obtención del BALF	39
Aislamiento de los exosomas a partir del BALF	39
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	40
PAGE-SDS	40
<i>PAGE-SDS en gradiente</i>	40
<i>PAGE-SDS discontinua</i>	40
Transferencia electroforética a membranas	41
<i>Membranas de immobilon-nylon</i>	41
<i>Membranas de nitrocelulosa</i>	41
Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas	41
<i>Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de immobilon-nylon</i>	41
<i>Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa</i>	42
Caracterización de los exosomas mediante citometría de flujo	43
<i>Anclaje de los exosomas a bolas de látex</i>	43
<i>Citometría de flujo</i>	43
Centrifugación en gradiente de sacarosa	43
Espectroscopía de infrarrojo	43
Espectrometría de masas	44
Microarrays de DNA	45
Red de interacción entre proteínas/genes	45
Predicción de mRNAs diana para los microRNAs	46
Predicción de rutas de KEGG enriquecidas	46
I.II ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DEL BALF	47
MÉTODOS	47
Protocolo profiláctico con exosomas	47
Supresión “bystander”	48
Sensibilización con Exo _{Al}	49
Análisis histopatológico	49
Determinación de los niveles de anticuerpos específicos en suero	50
<i>Preparación de los sueros de ratón</i>	50
<i>Determinación de los niveles de IgE total</i>	50
<i>Determinación de los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos</i>	50
Estudio de la respuesta de las células T específicas	51
<i>Cultivo de células esplénicas</i>	51
<i>Determinación de los niveles de citoquinas</i>	51

<i>Proliferación de células T</i>	51
Estudio de los niveles de mRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	52
<i>Aislamiento de RNA total</i>	52
<i>Síntesis de cDNA</i>	52
<i>Amplificación de cDNA mediante RT-PCR</i>	52
BLOQUE II. NANOVESÍCULAS DE SECRECIÓN DERIVADAS DEL POLEN COMO VEHÍCULOS DE ALÉRGENOS	53
MATERIALES	53
Anticuerpos monoclonales y policlonales	53
<i>Inmunodetección</i>	53
<i>Inmunolocalización para TEM</i>	53
<i>Inmunolocalización para microscopía láser confocal (CLSM)</i>	53
Medios de germinación <i>in vitro</i> del polen	53
Pacientes	54
Polen	54
MÉTODOS	54
Germinación <i>in vitro</i> del polen	54
Purificación de las NVS a partir del medio de germinación	55
Recolección del material biológico aerotransportado	55
Extractos de pólenes	56
Centrifugación en gradiente de sacarosa	56
PAGE-SDS	56
Transferencia electroforética y aplicación directa de proteínas a membranas de nitrocelulosa	57
Inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa	57
Espectrometría de masas y secuenciación <i>de novo</i>	57
Espectroscopía de infrarrojo	58
TEM	58
Inmunolocalización de proteínas para TEM	58
Inmunolocalización de Ole e 12 para CLMS	59
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	59
Pruebas cutáneas	60
Test de activación de basófilos	60
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
 BLOQUE I. EXOSOMAS TOLEROGÉNICOS DERIVADOS DEL BALF COMO POSIBLE VACUNA NASAL PARA LA ALERGIA	61
ARTÍCULO I. EXOSOMAS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR DE RATONES TOLERANTES PREVIENEN LA REACCIÓN ALÉRGICA	61
ANEXO I. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE RATÓN TOLERANTE A Ole e 1	71
Inducción de tolerancia	71

Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 sobre los niveles de anticuerpos específicos en suero	71
Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 sobre la respuesta de las células T específicas	72
Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 en las vías aéreas inferiores	73
ANEXO II. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE EXOSOMAS CONTROL EN LA SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA	76
Efecto de la administración i.n. de Exo _{Con} sobre los niveles de anticuerpos específicos en suero	76
Efecto de la administración i.n. de Exo _{Con} en la respuesta de las células T específicas	77
Efecto de la administración i.n. de Exo _{Con} en la inflamación de las vías aéreas inferiores	78
ARTÍCULO II. SUPRESIÓN ACTIVA DE LA SENSIBILIZACIÓN A UN ALÉRGENO NO RELACIONADO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE EXOSOMAS TOLEROGÉNICOS EN RATÓN	81
ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DEL BALF MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FTIR Y ESTRATEGIAS ÓMICAS	87
Estudio comparativo mediante espectroscopía FTIR	87
Estudio comparativo de los exosomas derivados del BALF mediante estrategias ómicas	89
<i>Análisis proteómico comparativo en los exosomas derivados del BALF</i>	90
<i><u>Digestión trípica en gel</u></i>	90
<i><u>Digestión trípica y quimotríptica en solución</u></i>	91
<i><u>Red de interacción entre las proteínas identificadas en los Exo_{Con} y Exo_{Tol}</u></i>	99
<i>Análisis transcriptómico comparativo de los exosomas derivados del BALF</i>	104
<i><u>Expresión diferencial de genes</u></i>	106
<i><u>Análisis de microRNAs</u></i>	119
<i><u>Predicción de mRNAs diana para los microRNAs</u></i>	123
<i><u>Predicción de rutas de KEGG enriquecidas</u></i>	127
<i><u>Vía de señalización TGF-β</u></i>	129
<i><u>Vía de señalización mTOR</u></i>	130
<i><u>Vía de señalización ErbB</u></i>	131
<i><u>Vía de señalización FAK</u></i>	132
<i><u>Vía de señalización en guía del axón</u></i>	133
ANEXO III. EXOSOMAS ALERGÉNICOS: CARACTERIZACIÓN E IMPLICACIÓN EN LA REACCIÓN ALÉRGICA	139
Aislamiento y caracterización físico-química de los Exo _{Ale}	139
Espectro FTIR de los Exo _{Ale}	140

Efecto de la administración i.n. de Exo _{Ale} sobre los niveles de anticuerpos específicos en suero	141
Efecto de la administración i.n. de Exo _{Ale} en la respuesta de las células T específicas	142
Efecto de la administración i.n. de Exo _{Ale} en la inflamación de las vías aéreas inferiores	143
Efecto de la administración i.n. de Exo _{Ale} en los marcadores de inflamación ADAM-8 y CCL11	144
Establecimiento de un modelo de ratón alérgico a Ole e 1 basado en la administración de Exo _{Ale}	146
<i>Determinación de los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos de Ole e 1 en suero</i>	146
<i>Evaluación de la respuesta de las células T específicas de bazo</i>	146
BLOQUE II. NANOVESÍCULAS DE SECRECIÓN DERIVADAS DEL POLEN COMO VEHÍCULOS DE ALÉRGENOS	149
Los polensomas son liberadas durante la germinación del grano de polen <i>in vitro</i>	150
Espectro FTIR de los polensomas de olivo	151
Análisis proteico de los polensomas	153
<i>Determinación del proteoma de los polensomas</i>	153
Polensomas, un nuevo mecanismo de liberación de alérgenos	160
<i>Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa</i>	161
<i>Inmunolocalización de Ole e 1 y Ole e 12 en los polensomas mediante TEM</i>	161
Inmunolocalización de Ole e 12 en el grano de polen maduro y germinado	162
Los polensomas son secretados tras la hidratación y el crecimiento del tubo polínico	165
Los polensomas juegan un papel activo en la alergia	169
<i>Estudio in vitro de la unión de IgE de pacientes alérgicos a polensomas</i>	169
<i>Estudio de activación de basófilos in vitro</i>	169
<i>Pruebas cutáneas en pacientes alérgicos</i>	170
Polensomas, vehículos de alérgenos en especies no relacionadas filogenéticamente. Implicación en fenómenos de reactividad cruzada	171
<i>Los polensomas están presentes en el aerosol atmosférico</i>	174
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	181
APÉNDICES	
ABREVIATURAS	233
LISTADO DE FIGURAS	239
LISTADO DE TABLAS	243

SUMMARY

Allergy is a major public health problem that affects the quality of life of millions of children and adults. Its prevalence has dramatically increased in many countries, particularly in industrialized ones, where it affects more than 25% of the population. In Mediterranean countries and some areas of America, South Africa, Japan, and Australia, one of the most common causes of pollinosis is olive tree (*Olea europaea*) pollen. The main allergen of this pollen is Ole e 1, which has been described as a diagnostic marker for sensitization to *Oleaceae* pollens. Therefore, Ole e 1 has been selected as a model allergen for the development of novel therapeutic strategies for allergy.

Currently, allergen-specific immunotherapy (SIT) is the only curative treatment available for allergic patients that results in immunological allergen unresponsiveness. Even though this treatment can offer protection, it faces several problems, such as long duration, anaphylactic side effects, and limited efficacy. Consequently, there is a clear need to develop alternative strategies to SIT aiming to reinstate peripheral tolerance against allergens. Mucosal vaccines, which are based on the mucosal tolerance phenomenon, represent an alternative strategy to conventional SIT. Studies in mouse model of allergy have revealed promising results on mucosal tolerance induction with allergens or their derivatives in prophylactic as well as therapeutic approaches.

Over the past several years, the use of exosomes as cell-free vaccines or therapeutic agents for the treatment of several human diseases, such as cancer, infections, autoimmune diseases and transplantations, has been proposed. Exosomes represent a new family of small vesicles (30-100 nm in diameter) which are released by most cell types, including epithelial cells, neurons, tumor cell lines, mast cells, dendritic cells, T and B cells. They have been also isolated from several body fluids, such as serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), urine, malignant effusions, amniotic fluid, saliva, breast milk and bile. This fact suggests that exosomes secretion is a naturally occurring phenomenon. Moreover, exosome secretion is not specific of mammalian cells, since it has been also shown from avian reticulocytes, salmon leukocytes, bacteria, fungi, and intracellular parasites as *Leishmania*. They form by invagination of the limiting membrane of endocytic compartments, which results in the formation of vesicle-containing endosomes, called multivesicular bodies (MVBs). Fusion of MVBs with the plasma membrane leads to the release of intraluminal vesicles (ILVs), called exosomes, in the extracellular medium. Exosomes are limited by a lipid bilayer with round-shaped in electron microscopy and a density between 1.13 and 1.19 g/ml, depending on the producing cell type.

Exosomes contain a define set of cellular proteins: some are commonly expressed exosome-proteins -such as tetraspanin, adhesion molecules, cytosolic enzymes and certain stress proteins-, and can be compiled to define a “canonical” exosomes. Conversely, other exosomal proteins directly represent the proteome of the origin cell and its physiologic state. In addition, exosomes also contain active genetic information -messenger RNA and microRNA (miRNA)- that can be transferred into a recipient cell, acquiring new functional properties. Thus, exosomes may also be valuable as biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment success.

The role of exosomes *in vivo* is unknown, but it has been shown that their function depend on the origin cell and their molecular composition. Numerous evidences have been shown that exosomes play a

role in modulating immune response, including both immune stimulation and immune suppression (named tolerogenic exosomes). An additional role for exosomes in pathogenesis is suggested by various studies showing that they act as an easy vehicle for pathogens, including viruses, prions and other infectious agents. Update, however, scarce studies have analyzed the role of exosomes in allergy.

The main objective of the present thesis was to analyze the role of exosomes in allergy: both as *vaccines* for the treatment of this disease and as *vehicles of allergens*, contributing to the allergen sensitization and/or the development of the allergic response.

In the first set of experiments, the aim of the study was to evaluate the potential use of tolerogenic exosomes as a nasal vaccine against allergy in mice.

In order to obtain tolerogenic exosomes, we established a mouse model of tolerance to Ole e 1 by i.n. administration of high amounts of the allergen during three consecutive days. Blood, lungs and spleen were collected and analyzed for immune response. The tolerogenic state was analyzed by determining antibody levels in serum, T cell response *in vitro* and airway inflammation.

Exosomes were isolated from BALF of tolerized (Exo_{Tol}) or *naïve* (Exo_{Con}) mice, as control, by the well-established filtration/ultracentrifugation procedure. To confirm that recovered vesicles were typical exosomes, they were characterized by electron microscopy, flotation on a sucrose gradient, Western blot and FACS analysis. Exo_{Con} and Exo_{Tol} were round-shaped vesicles of 30-45 nm in diameter, floated at density close to 1.12 g/ml and displayed exosomal proteins as ICAM-1, CD9, hsc70, Tsg101, flotillin, Alix and clathrin. In addition, BALF-derived exosomes expressed surfactant-associated protein B (SP-B) that is synthesized and stored by type-II alveolar epithelial cells. This result suggested that these cells are the main source of exosomes in BALF.

To examine whether Exo_{Tol} could protect against allergic sensitization in a mouse model of allergy induced by Ole e 1/Al(OH)₃ sensitization followed by airway challenges, mice were i.n. pretreated with Exo_{Tol} before sensitization to Ole e 1, and the allergen-specific response was analyzed. *Sham*-pretreated mice received Exo_{Con} as control since these animals developed an allergic state comparable to that observed in untreated mice sensitized and challenged with the allergen. The pretreatment with Exo_{Tol} inhibited three important clinical parameters that characterized allergic response in humans: serum specific-IgE antibody levels, Th2 cytokine production, and airway inflammation. Moreover, this protection was maintained when Exo_{Tol} were given 10 weeks before sensitization/challenge to Ole e 1 (*long-term effect*). This protective effect was associated with a concomitant increase in the expression of the regulatory cytokine TGF- β . These results demonstrated that exosomes can induce tolerance and protection against allergic sensitization in mice. Thus, exosomes-based vaccines could represent an alternative to conventional therapy for allergic disease in humans.

Moreover, we investigated whether Exo_{Tol} specific to Ole e 1 could also prevent sensitization to the unrelated allergen Bet v 1, the main allergen from birch pollen. Intranasal pretreatment with Exo_{Tol}, one week prior to sensitization/challenge to Bet v 1, proved to be successful in preventing sensitization, as indicated by a significant reduction in serum specific-IgE antibody levels, Th2 cytokines and airway inflammation. In conclusion, Exo_{Tol} specific to Ole e 1, in addition to inhibit specific immune response to this allergen, blocked the allergic response to a second unrelated allergen. This phenomenon -known as

“bystander suppression”- that we herein describe for Exo_{Tol} may have implications in terms of their potential use as a cell-free vaccine for allergy based on mucosal tolerance induction.

The significance of these preliminary but promising findings awaits further experimentation.

The ability of Exo_{Tol} to protect against allergic sensitization is likely to underlie the physiological state of the cell from which exosomes were derived and their molecular composition in terms of lipids, carbohydrates, RNAs and proteins. In order to find out these molecules, we carried out comparative proteomic and transcriptomic studies among Exo_{Con} and Exo_{Tol}. In addition, Fourier Transform Infrared spectroscopy was capable of detecting differences in composition between both types of vesicles.

For proteomic studies, exosomes were digested with trypsin and chymotrypsin, and peptides were analyzed by HPLC-MS/MS. It was identified a total of 170 proteins which 66 were found in Exo_{Con}, 77 in Exo_{Tol} and 27 were common to both types of microvesicles. Our analysis identified several common exosomal proteins as well as proteins not previously described on exosomes. The proteomic study allows us to propose several candidate proteins as potentially responsible of immunosuppressive effects of Exo_{Tol}. According to their immunomodulatory properties, highlight: histone H4, coronin 1A, SP-A and SP-D. Based on the degree of connection between proteins generated by *STRING 9.0* software, it stands out cytoplasmic actins 1 and 2, SP-B and SP-C.

For transcriptomic studies, total RNA from Exo_{Con} and Exo_{Tol} was isolated and analyzed by *Bioanalyzer 2100B*. Exosomes were enriched in small RNAs (< 200 nucleotides) and were devoid of ribosomal RNA or DNA. Comparative analysis by DNA microarrays allowed to identify a set of 74 genes overexpressed and 43 repressed in Exo_{Tol} versus Exo_{Con}. Interactions between differentially expressed genes generated by *STRING 9.0* enabled to propose several candidate genes potentially associated with immunosuppressive properties: *Actr1a*, *Spred2* and *Arhgef12*. Additionally, these genes appear in clusters that are involved in regulation of the actin cytoskeleton and signal transduction. DNA microarrays analysis also revealed that 10 miRNAs were overexpressed and 4 repressed in Exo_{Tol} compared to Exo_{Con}. In accordance to several bioinformatics softwares, it can be suggested miR-15a and miR-103/107 as candidates involved in the protective effect of Exo_{Tol}. Another possible candidate miRNA could be miR-99b due to its regulatory role in the TGF- β pathway. Nevertheless, these results are based on bioinformatic analysis and they should be validated by other techniques *in vitro* and *in vivo*.

The physiologic or pathologic role of exosomes in lungs *in vivo* is not clear yet. However, the proteomic and transcriptomic analysis performed in this thesis allowed to identify proteins and genes involved in lung homeostasis- such as SP-A, SP-B, SP-C, and SP-D-, adaptive and innate immune response -SP-A, SP-D, uteroglobin, Lcn2 and ICAM-1-. These results suggest that exosomes could play a role in the physiology and defense of the lung. This hypothesis is supported by the observation that exosomes are present in BALF of birch pollen allergic patients and healthy individuals as well as the demonstration that human tracheobronchial epithelial cells secrete exosomes-like vesicles.

In another set of experiments we try to figure out whether exosomes could have a role in the pathogenesis of allergy. To this aim, we investigated the effect of i.n. administration of BALF-derived exosomes from mice sensitized to Ole e 1 (Exo_{Al_e}) before sensitization/challenge to this allergen. As control, *sham*-pretreated mice received by i.n. route Exo_{Con} one week prior to sensitization/challenge.

Exosomes were isolated from BALF of sensitized mice by the well-established filtration/ultracentrifugation procedure. Recovered vesicles were typical exosomes as confirmed by electron microscopy, flotation on a sucrose gradient and Western blot. Pretreatment with Exo_{Ale} one week before of sensitization/challenge to Ole e 1 do not change specific-IgE, IgG1 antibody levels in serum, but increased IgG2a, compared to *sham*-pretreated mice. In contrast, pretreatment with Exo_{Ale} led to a significant increase in Th2 cytokine (IL-4 and IL-5) production and mRNA levels of ADAM-8 and CCL11 - identified as inflammatory markers in airways-. In conclusions, Exo_{Ale} appear to favour allergen-induced Th2 inflammation, suggesting that exosomes could play a role in allergy. Moreover, from the data reported herein, we hypothesize that the structural heterogeneity of the exosomes in mouse BALF reflects their functional diversity.

Finally, we also investigated the capacity of Exo_{Ale} to induce an allergic response *in vivo*. For this purpose, Exo_{Ale} were given i.n. or i.p. before Ole e 1 challenge. Exo_{Ale} were not able to induce an allergic response in mice, as evidenced by the absence of specific antibody response in serum and Th2 cytokine production. Thus, under these experimental conditions, we could not demonstrate the allergenic activity of Exo_{Ale} *in vivo*, and further studies are required.

In the second set of experiments we hypothesized that pollen could secrete exosome-like vesicles that could act as vehicle for allergens.

Allergen release from pollen is a prerequisite for sensitization and elicitation of the allergic symptoms in humans. Researches have suggested that allergen liberation from pollen grains occurs in two different compartments: first, outside the individual organism in the ambient air itself, and second, on the mucosal surface of the upper respiratory tract after exposure to pollen. Previous studies have shown, that the air, in addition to carrying airborne pollen, contains allergenic pollen-derived submicronic (<10 µm) and paucimicronic (<1 µm) particles that can reach the lower airways, eliciting allergic symptoms in susceptible subjects. These particles are mainly composed of starch granules and polysaccharide-particles, structures that are scarce or absent in mature olive pollen.

Vesicular trafficking plays an essential role in diverse plant biological processes including immune response and development. In flowering plants, pollination relies on a dramatic polar cell growth process, the pollen tube elongation. This growth is supported by an active secretory system at plasma membrane level, whereby exocytic vesicles at the subapical region deliver new materials required for cell elongation. Concerning exosomes-like vesicles in plants, only one report has demonstrated their existence in sunflower apoplastic fluid, although several evidences have suggested that they could be involved in cell-wall associated defense response upon pathogen attack. These observations have prompted us to suggest that this alternative secretory pathway could be implicated in other plant biological processes such as pollen germination and pollen tube growth, being a potential mechanism of allergen release into the atmosphere.

Exosome-like vesicles -termed pollensomes- were purified from *in vitro* olive pollen germination media by the well-established filtration/ultracentrifugation procedure employed for isolation of BALF-derived exosomes, with minor changes. Pollensomes, 28-60 nm in size, displayed round-shaped morphology in electron microscopy and floated on a sucrose gradient at density between 1.24 g/ml and 1.29 g/ml. Proteomic analysis showed that pollensomes contain a large number of proteins, many of

which display well-known roles in metabolism and signaling, cell wall expansion, transport and cytoskeleton formation: all are biological functions needed in pollen germination and pollen tube growth. Relevant allergens of olive pollen, including Ole e 1, Ole e 11 and Ole e 12, were detected in olive pollensomes by Western blot and proteomic analysis. Moreover, pollensome secretion seemed to be a widespread mechanisms of allergen release because several clinically relevant species as birch (*Betula verrucosa*), ryegrass (*Lolium perenne*), and pine (*Pinus sylvestris*) release them during *in vitro* germination. Most importantly, pollensomes exhibit allergenic activity as we demonstrated in this thesis by means of the IgE-binding capacity, activation of human basophiles and positive skin prick test in allergic patients to olive pollen. The potential implications for these findings in allergy are supported by the fact that pollensomes were presented in atmospheric aerosol. In this regard, and because of their small size, pollensomes would facilitate access of allergens to the lower respiratory tract where could trigger an allergic reaction in susceptible people. Finally, our findings indicate that pollensomes comprise a heterogeneous population of secretory vesicles, but we cannot conclude that one of the pollensome subpopulations are exosomes-like vesicles.

In conclusion, these findings, which have to be further studied in detail, may have important implications in allergic response. They open a new dimension in the understanding of early events in both allergic sensitization and exacerbation of the disease prior to allergen-induced mechanism. Moreover, pollensomes described in this study provide a unique insight into the dynamics of protein secretion during the processes of pollen germination and pollen tube growth, which are critical for successful fertilization in flowering plants.

INTRODUCCIÓN

LA REACCIÓN ALÉRGICA

Las enfermedades alérgicas se conocen desde la antigüedad, pudiéndose encontrar referencias a la diagnosis y el tratamiento de éstas en textos de las culturas hebrea y greco-romana, incluso en escritos de la antigua China, Mesopotamia e India (**Tabla 1**). Probablemente, la primera descripción de un cuadro clínico compatible con una reacción anafiláctica fue consignada en piedra por los egipcios en torno al año 3.000 a.C., en la que se documentó la muerte del faraón Menes como consecuencia de la picadura de una avispa.

Siglos más tarde, el médico árabe Rhazes (865-932) realizó la primera descripción en la historia de la medicina de la rinitis alérgica estacional producida por el polen, en su obra *Una disertación sobre la causa del coriza que ocurre en la primavera, cuando las rosas liberan su perfume*. Esta misma relación entre floración, primavera y síntomas fue descrita por Lusitanus en el año 1.556, el cual atribuyó la presencia de estornudos en algunos individuos al oler el perfume de las rosas. En el año 1.565, Botallus acuña el término **catarro o mal de las rosas**, para designar los síntomas que presentaban sus pacientes al oler determinadas flores, como las rosas: cefalea, prurito nasal y estornudos.

A principios del siglo XIX, el médico inglés Bostock introdujo en la literatura médica el término **fiebre del heno**, que desbancó al término **catarro de las rosas**, para definir una afección periódica de los ojos y los bronquios que presentaban sus pacientes, atribuyendo erróneamente la génesis del proceso a la exposición al calor y a la luz del sol [Bostock, 1928]. En relación a la terminología, fue el médico español Sánchez-Cuenca quien comentó en su obra *Polinosis*, publicada en el año 1.934, la singularidad de que las primeras observaciones de polinosis estuviesen relacionadas con la floración de los rosales, ya que la sensibilización al polen de las rosas es muy poco común [Sánchez-Cuenca, 1934]. Las primeras sospechas de que el polen podía ser la causa de la **fiebre del heno** fueron documentadas por Wyman en el año 1.872, pero fue Blackley en 1.873 el que relacionó directamente la intensidad de sus síntomas, ya que era alérgico, con el recuento de polen atmosférico que él mismo realizaba [Wyman, 1872; Blackley, 1873].

Durante el siglo XX se llevaron a cabo la mayoría de los trabajos pioneros que han permitido comprender los mecanismos patofisiológicos de los procesos alérgicos. En el año 1.906, von Pirquet acuñó el término **alergia** (del griego *allos* y *ergon*, “reacción extraña”) mientras estudiaba la “enfermedad del suero”, para describir algunos de los síntomas que desarrollaban los individuos al ser tratados con un suero anti-toxina de caballo [von Pirquet, 1906]. El término **atopia** (del griego *atopia*, “fuera de lugar”) fue introducido en el año 1.923 por Fernández-Coca, para describir a los individuos que presentaban una predisposición genética para desarrollar enfermedades alérgicas [Coca, 1923]. En 1.921, Prausnitz y Küstner observaron que la sensibilidad a determinados alérgenos podía ser transferida a una persona sana mediante la inyección del suero de un individuo alérgico [Prausnitz & Küstner, 1921]. A este factor sérico, capaz de ocasionar hipersensibilidad, se le dio el nombre de **reagína** y durante mucho tiempo la reacción de Prausnitz-Küstner fue el único método para detectar y medir la actividad **reagínica** del suero. Más tarde, hacia finales de la década de los 60, los trabajos pioneros del matrimonio Ishizaka identificaron este factor reagínico como un nuevo tipo de inmunoglobulina (Ig): la **IgE** (E, de eritema) [Ishizaka *et al.*, 1966]. El descubrimiento de la IgE permitió el desarrollo de técnicas *in vitro* para medir la

respuesta inmune en pacientes con alergia, cayendo en desuso la reacción de Prausnitz-Küstner debido al riesgo de transmisión de infecciones, como la hepatitis viral o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Tabla 1. Hitos históricos en el conocimiento de la alergia.

Año	Autor/es	Avance/Descripción
~3.000 a. C.	Egipto	Muerte del faraón Menes por la picadura de una avispa
~900 d. C.	Rhazes	Primera descripción médica de la rinitis alérgica estacional
1.556	Lusitanus	Descripción de estornudos al inhalar el perfume de las rosas
1.565	Botallus	Descripción del <i>catarro o mal de las rosas</i>
1.828	Bostock	Introducción del término <i>fiebre del heno</i>
1.872	Wyman	El polen como posible causa de la <i>fiebre del heno</i>
1.873	Blackley	Relación directa entre sintomatología alérgica y recuento de polen
1.906	von Pirquet	Introducción del término <i>alergia</i>
1.921	Prausnitz & Küstner	Transferencia pasiva de la sensibilidad a personas sanas mediante el suero de individuos alérgicos
1.923	Fernández-Coca	Introducción del término <i>atopia</i>
1.966	Ishizaka <i>et al.</i>	Identificación de los anticuerpos IgE

En España, el gran impulsor del estudio de las enfermedades alérgicas fue Jiménez Díaz, que publicó en 1.932 el tratado *El asma y otras enfermedades alérgicas* [Jiménez-Díaz, 1932]. Junto a los Doctores Lahoz Marqués y Farrerons Co funda en el año 1.948 la Sociedad Española de Alergia, predecesora de la actual Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC, <http://www.seaic.org/>).

Hoy en día se sabe que la alergia atópica es una enfermedad por hipersensibilidad inmediata o de tipo I, caracterizada por la producción de elevados niveles de anticuerpos IgE en suero, frente a antígenos ambientales inocuos para la mayoría de los individuos, denominados **alérgenos**. En general, los alérgenos son proteínas o glicoproteínas de baja masa molecular (5-70 kDa) con una elevada estabilidad y solubilidad en los fluidos corporales. Estos antígenos se encuentran presentes en diversas fuentes biológicas, como los pólenes, epitelios de animales, ácaros del polvo, venenos de insectos, alimentos, hongos o látex [Kay, 2008]. Los diferentes síntomas clínicos y tipos de alergias vienen determinados por la ruta de acceso del alérgeno al organismo: el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal, la piel y/o mediante la picadura de un insecto o la inyección de un fármaco [Kay, 2008]. Las manifestaciones clínicas, que se pueden presentar aisladas o en combinación, incluyen desde reacciones locales, como asma alérgica, rinoconjuntivitis, sinusitis, trastornos gastrointestinales, dermatitis atópica, urticaria y angioedema, hasta reacciones sistémicas severas como el *shock* anafiláctico, que pueden comprometer la vida del paciente.

Las enfermedades alérgicas han alcanzado proporciones pandémicas y su prevalencia continúa aumentando de forma alarmante, sobre todo en los países industrializados, con un estilo de vida occidental, donde pueden llegar a afectar a más del 25% de la población [Floistrup *et al.*, 2006]. Diversos estudios epidemiológicos han observado que la etiología de las reacciones alérgicas es compleja y está influenciada por varios factores, denominados factores de riesgo [Akdis & Akdis, 2011]:

- I. Factores genéticos. En el genoma humano se han descrito múltiples regiones en los cromosomas 5, 6, 11, 12 y 14 que contienen genes implicados en el desarrollo y progresión de las reacciones alérgicas. A pesar de esto, la susceptibilidad genética de un determinado individuo a desarrollar algún tipo de alergia está modificada por interacciones de tipo: gen-gen, gen-medioambiente, incluso por modificaciones epigenéticas del genoma [Steinke *et al.*, 2008].
- II. Factores ambientales. La polución, los productos irritantes o el humo del tabaco, incluso la co-exposición del alérgeno con sustancias que estimulan la inmunidad innata -como determinados tipos de infecciones o la flora bacteriana- pueden aumentar el riesgo de desarrollar alergia o exacerbar los síntomas. Además, se ha descrito que el ejercicio físico o la exposición al sol pueden contribuir al cuadro clínico de la enfermedad.
- III. Las características intrínsecas -estructurales y/o funcionales- del alérgeno, así como la dosis, la ruta y el tiempo de exposición al mismo.

MECANISMO DE LAS REACCIONES ALÉRGICAS

Los mecanismos que subyacen a las reacciones alérgicas pueden ser divididos en dos etapas principales. Una primera **fase de sensibilización y desarrollo de memoria celular**, seguida por la **fase efectora**, la cual a su vez se subdivide en *respuesta inmediata* y *respuesta tardía*. La **Figura 1** muestra un esquema del mecanismo de la reacción alérgica.

Fase de sensibilización y desarrollo de memoria celular

Durante la sensibilización, el alérgeno entra en contacto con la superficie de las mucosas donde es capturado y procesado por las células presentadoras de antígeno (APCs) profesionales, principalmente las células dendríticas (DCs) [Hammad & Lambrecht, 2008]. Seguidamente, las DCs migran a la zona T de los ganglios linfáticos y presentan los péptidos derivados del alérgeno en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (en ratón, MHC-II y en humanos, HLA-II) a las células T CD4⁺ *naïve* (Th0), que expresan los receptores de células T (TCRs) específicos para dicho complejo, activándolas y provocando su diferenciación.

Dependiendo de la capacidad de las sustancias co-expuestas con el alérgeno para activar una respuesta inmune innata, las señales para la diferenciación celular, el estado de la célula y las citoquinas presentes en el microentorno, las células Th0 se pueden diferenciar en: Th1, Th2, Th9, Th17 y Th22 [Akdis & Akdis, 2011] (**Figura 1**).

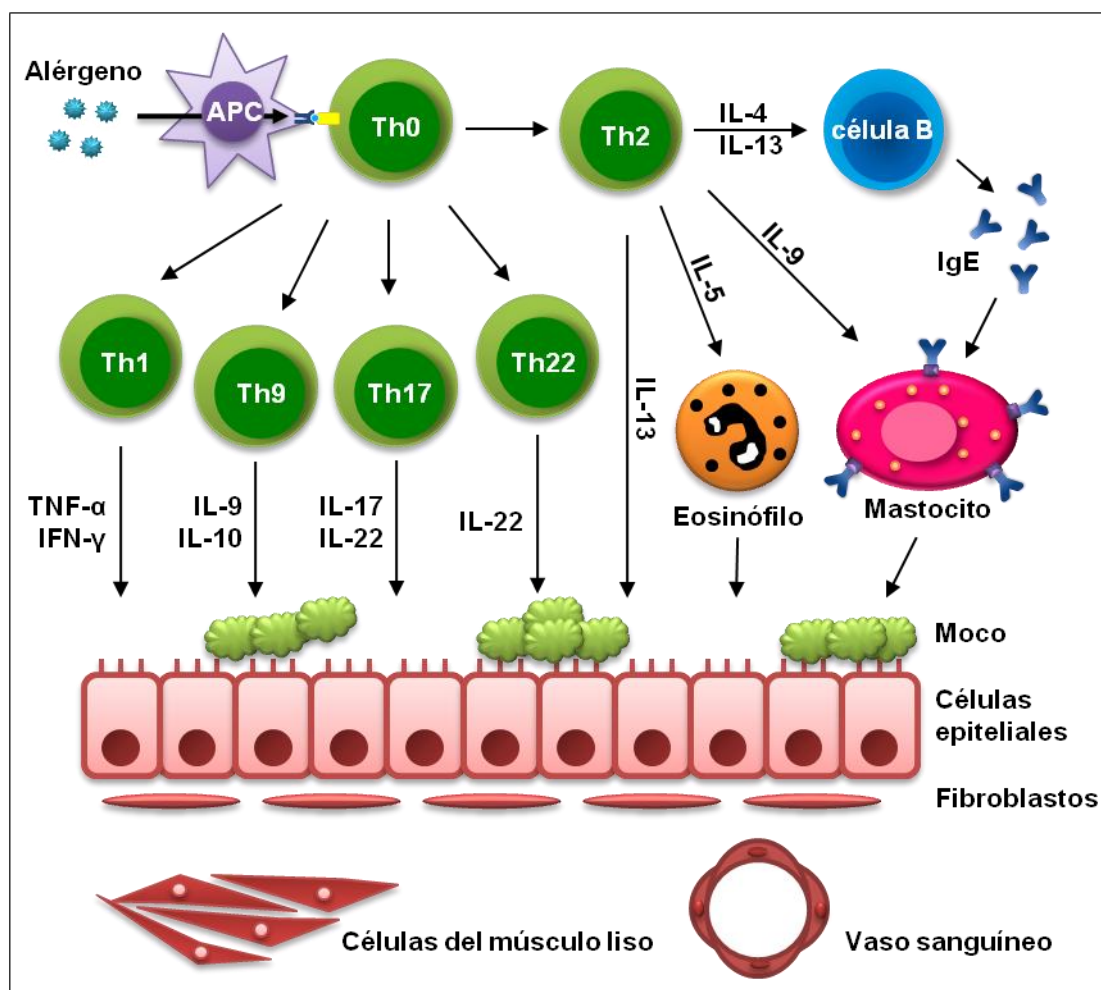


Figura 1. Mecanismo de la reacción alérgica. Adaptado de Holgate & Polosa [2009].

En el caso de las reacciones alérgicas se produce la diferenciación y expansión clonal de las células Th2 específicas del alérgeno, las cuales son responsables de la inmunopatología y de la clínica de la enfermedad. Estas células producen interleuquina (IL)-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), así como otras citoquinas identificadas recientemente, como IL-25, IL-31 e IL-33 [Akdis & Akdis, 2011]. Estas citoquinas están implicadas en diferentes funciones como: el cambio de isotipo de IgM a IgE en las células B (IL-4 e IL-13) -las cuales se activan y diferencian a células plasmáticas-, el reclutamiento de mastocitos (IL-4, IL-9 e IL-13) y la maduración de eosinófilos (IL-3, IL-5 y GM-CSF) y basófilos (IL-3 e IL-4) [Holgate & Polosa, 2008]. Además, en esta etapa se establece un repertorio de células B y T de memoria específicas del alérgeno, así como su expansión clonal.

Los anticuerpos IgE circulantes se unen a receptores de IgE de alta afinidad (FcεRI) presentes en la superficie de las células efectoras (mastocitos y basófilos), formando complejos IgE-FcεRI, lo que provoca la sensibilización de los pacientes a un determinado alérgeno [Kalesnikoff & Galli, 2008; Simons, 2010]. Los anticuerpos IgE presentes en el suero tienen una vida media corta (2 días) en comparación con otros anticuerpos, como la IgG (21-23 días), pero una vez que son secuestrados por el FcεRI su vida media aumenta hasta los 10 días.

Fase efectora

Respuesta inmediata

Tiene lugar una vez que el individuo, previamente sensibilizado, contacta de nuevo con el alérgeno, el cual se une a los complejos IgE-FcεRI presentes en la superficie de las células efectoras. Esta unión provoca el entrecruzamiento de los complejos, activándose una cascada de señalización que deriva en la desgranulación de las células, con la consiguiente liberación al entorno de sustancias anafilactogénicas, además de producirse una síntesis rápida de nuevos mediadores. Entre estas sustancias liberadas se encuentran: aminas vasoactivas (p. ej., histamina), mediadores lipídicos (p. ej., prostaglandina D y leucotrienos), ligandos de receptores de quimioquinas CXC (p. ej., CXCL8 y CXCL10) y de quimioquinas CC (p. ej., CCL2, CCL4 y CCL5), y otras citoquinas (p. ej., IL-4, IL-5 e IL-13). Todas estas moléculas son las responsables de los síntomas clínicos que caracterizan la fase inmediata de la reacción alérgica, los cuales se manifiestan durante los 30 primeros minutos desde la entrada del alérgeno [Kalesnikoff & Galli, 2008; Simons, 2010].

Las IgE específicas del alérgeno también se unen a FcεRI de la superficie de DCs y monocitos, así como a receptores de IgE de baja afinidad (FcεRII o CD23) presentes en la superficie de células B. Este proceso incrementa la captura del alérgeno por estas APCs y la posterior presentación de los péptidos derivados del alérgeno a las células Th2 específicas, eventos que contribuyen a la iniciación de la respuesta tardía de la reacción alérgica.

Respuesta tardía

Las quimioquinas liberadas durante la respuesta inmediata por las células efectoras dirigen el reclutamiento de mastocitos, basófilos, eosinófilos y células Th2 específicas a los sitios de entrada del alérgeno, lo que deriva en una inflamación local. Los mastocitos y basófilos activados liberan histamina, quimioquinas y citoquinas, mientras que las células Th2 específicas se reactivan y expanden clonalmente. Éstas últimas producen grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, citoquinas implicadas en el mantenimiento de unos niveles elevados de IgE específica, la diferenciación de mastocitos, la hipersecreción de moco, la contracción de la musculatura lisa y el desarrollo e influjo de células inflamatorias a los tejidos inflamados [Akkoc *et al.*, 2011].

Los eosinófilos -las células inflamatorias más importantes de la respuesta tardía- requieren IL-5, GM-CSF y eotaxina para su reclutamiento, maduración y supervivencia. Estas células liberan un gran número de mediadores proinflamatorios, incluyendo proteínas básicas (proteína catiónica, peroxidasa eosinofílica, proteína básica mayor y neurotoxina derivada del eosinófilo), citoquinas (IL-3, IL-5 e IL-13), mediadores lipídicos (p. ej., leucotrienos) y óxido nítrico. Dichas sustancias contribuyen al daño tisular, la inflamación bronquial, la producción de moco y la hiperreactividad de las vías aéreas [Akdis & Akdis, 2011]. A medida que la inflamación progresa se produce hiperplasia de las células epiteliales y remodelación de las vías aéreas.

En el pasado la respuesta alérgica se explicaba, fundamentalmente, debido a un desequilibrio entre las células Th1 y las Th2. Hoy en día se sabe que las células Th1 desarrollan funciones importantes en la inmunopatología de las reacciones alérgicas, así como otros subtipos de células T CD4⁺, como las células Th9, Th17 y Th22 [Sallusto & Lanzavecchia, 2009] (**Tabla 2**). Estas células pueden promover diferentes tipos de respuestas inflamatorias en base a su perfil de citoquinas,

respuesta a quimioquinas e interacción con otros tipos celulares, lo que ha hecho que hayan sido propuestas como dianas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades alérgicas [Akdis & Akdis, 2011].

Tabla 2. Papel de los diferentes subtipos de células T CD4⁺ en la alergia.

Célula	Citoquinas efectoras	Funciones en la respuesta alérgica	Referencia
Th1	IFN- γ , TNF- α	Apoptosis de queratinocitos de la piel, células epiteliales de las mucosas y células T	Akkoc <i>et al.</i> , 2008
Th2	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-31, IL-33	Inflamación alérgica, producción de IgE específica del alérgeno, eosinofilia y producción de moco	Larché <i>et al.</i> , 2006 Akdis <i>et al.</i> , 2011
Th9	IL-9, IL-10	Producción de moco e inflamación de los tejidos	Veldhoen <i>et al.</i> , 2008
Th17	IL-6, IL-8, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, TNF- α	Reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos en los tejidos inflamados	Burgler <i>et al.</i> , 2009
Th22	IL-22	Inflamación e hiperplasia de los tejidos en la dermatitis atópica	Nogales <i>et al.</i> , 2009

IFN, interferón; IL, interleuquina; TNF, factor de necrosis tumoral.

ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES ALÉRGICAS

El tratamiento de las enfermedades alérgicas se sustenta en tres pilares fundamentales (**Figura 2**): (I) el control ambiental mediante la identificación y evitación del alérgeno causante de la enfermedad, (II) el tratamiento farmacológico y (III) la inmunoterapia específica (SIT).

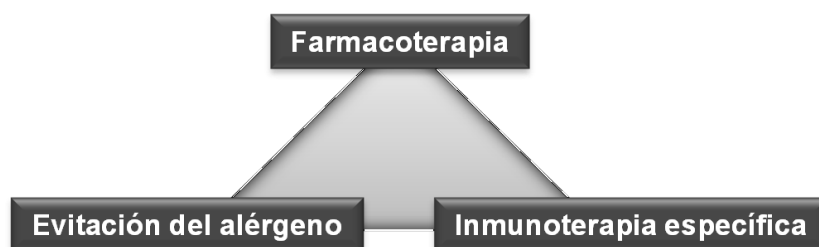


Figura 2. Tríada básica para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Evitación del alérgeno

Las personas alérgicas deben de ser informadas para que conozcan dónde se pueden encontrar los alérgenos a los que están sensibilizados, cómo entran en contacto con el cuerpo y qué medidas deben seguir para evitarlos [Holgate & Polosa, 2008]. Así, la evitación del alérgeno engloba una serie de normas que deben seguir los individuos alérgicos o atópicos para reducir o evitar por completo el contacto con los agentes sensibilizantes. Esto contribuye a la disminución de los síntomas agudos, la inflamación continua y la aparición de nuevas sensibilizaciones. Las fuentes alérgicas que se pueden evitar son las derivadas de pólenes, ácaros, epitelios de animales, hongos y alimentos. No obstante, se ha visto que la utilidad de la terapia de evitación es ineficaz ya que el control ambiental es complejo, difícil y muchas veces costoso. En el caso de las alergias alimentarias, eliminar las fuentes que contengan el alérgeno que desencadena las reacciones alérgicas es la base del tratamiento de la

enfermedad. Este tipo de medidas requiere una supervisión y monitorización continuada por parte del médico, sobre todo en los niños o en casos de alergias múltiples, ya que se corre el riesgo de provocar deficiencias alimentarias. Así, por ejemplo, los niños alérgicos a la leche de vaca requieren, para una correcta alimentación, sustitutivos alimenticios basados en hidrolizados de proteínas o aminoácidos [Koletzko & Koletzko, 2009].

Farmacoterapia

En el mercado hay disponibles numerosos fármacos para el tratamiento de las enfermedades alérgicas. En general, estas terapias reducen temporalmente los síntomas al neutralizar tanto las células implicadas en la inflamación alérgica como los mediadores y otros factores producidos por éstas. La problemática asociada con este tipo de terapias es que todas son paliativas, es decir, reducen los síntomas asociados con la enfermedad sin modificar el curso natural de la misma. Además, la interrupción de la medicación conlleva a la aparición de los síntomas una vez que el individuo se expone de nuevo al alérgeno. Los principales fármacos comercializados en España para el tratamiento de la alergia se detallan en la **Tabla 3** (Colegio Oficial de Farmacéuticos de España, www.portalfarma.com/home.nsf).

Inmunoterapia específica

La SIT representa, hoy en día, el único tratamiento curativo para las enfermedades alérgicas. Además de ser específica de antígeno, es capaz de modificar el curso natural de las enfermedades alérgicas y sus beneficios clínicos perduran después de suspender el tratamiento [Larché *et al.*, 2006]. Este tratamiento es especialmente efectivo en pacientes cuidadosamente seleccionados que presentan síntomas como rinitis alérgica, conjuntivitis o asma -causados por aeroalérgenos-, y reacciones anafilácticas -causadas por el veneno de himenópteros- [Till *et al.*, 2004]. Sin embargo, la SIT presenta algunos inconvenientes, como el riesgo de que se produzcan reacciones sistémicas graves que pueden llegar a comprometer la vida del paciente [Williams *et al.*, 2004].

El uso de la SIT para el tratamiento de las enfermedades alérgicas, en concreto para la “fiebre del heno” (rinitis alérgica), fue introducida hace más de 100 años por Noon [1911] (**Tabla 4**). Sus ensayos clínicos demostraron que la inyección subcutánea del extracto de polen al que los pacientes eran alérgicos, era capaz de inducir tolerancia inmunológica, logrando por lo tanto revertir el curso de la enfermedad. También observó una eficacia clínica evidente ya que los síntomas se reducían y aumentaba el umbral de tolerancia a la exposición del alérgeno -determinado mediante test de provocación conjuntival-. Así mismo, los beneficios de esta inmunización activa se prolongaban alrededor de un año después de la suspensión del tratamiento. La metodología empleada por Noon para el tratamiento de las enfermedades alérgicas fue aceptada por la comunidad científica y, a partir de ese momento, los estudios de las reacciones alérgicas se incrementaron exponencialmente.

Tabla 3. Fármacos empleados para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Fármaco	Mecanismo de acción	Síntoma a tratar/Efectos	Inconvenientes/Efectos adversos	Nombre genérico
Antihistamínicos de 1ª generación (clásicos o sedantes)	Antagonistas del receptor H1 de histamina	• Disminución de los síntomas de la respuesta inmediata	• Sedantes • Anticolinérgicos • Antivertiginosos • Orexigénicos	Dexclorfeniramina, hidroxicina, clemastina, ketotifeno
Antihistamínicos de 2ª generación (no sedantes)	Antagonista del receptor H de histamina	• Disminución de los síntomas de la respuesta inmediata	• Orexigénicos • Náuseas y/o vómitos • Ataxia	Cetirizina, loratadina, ebastina
Glucocorticoides (sistémicos, inhalados, nasales o tópicos)	Inhibidores de la expresión de citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión en las células Th2	• Reagudizaciones asmáticas • Asma persistente • Rinitis alérgica • Dermatitis atópica	• Inmunodepresión • Alteración del metabolismo • Disminución del crecimiento en niños • Hipoglucemia	Metilprednisolona, prednisona, prednisolona, beclometasona, budesonida, fluticasona, mometasona, hidrocortisona
Simpaticomiméticos (naturales y β₂-miméticos)	Antagonistas de los receptores α y β adrenérgicos	• Broncoconstricción • Vasoconstricción • Urticaria y angioedema	• Vasodilatación periférica a elevadas dosis • Temblores y/o taquicardias	Adrenalina, salbutamol, terbutalina, salmeterol, formoterol, bambuterol, clenbuterol
Antileucotrienos	Agonistas de leucotrienos	• Broncoconstricción • Inflamación de las vías aéreas • Episodios de asma • Rinoconjuntivitis	• No efectivo en dermatitis atópica • Elevado coste • Trastornos gastrointestinales y del sueño	Montelukast, pranlukast, zafirlukast
Cromonas	Inhibidores de la desgranulación de mastocitos	• Asma • Rinoconjuntivitis	• Inhalación repetida durante el día • Eficacia limitada condicionada al tratamiento continuado	Cromoglicato, nedocromil, lodoxamida
Anticolinérgicos	Inhibidores de receptores muscarínicos	• Broncoconstricción • Secreción de moco • Crisis asmáticas	• Sólo se administra en asociación con β ₂ -miméticos o para la rinorrea	Bromuro de ipratropio
Xantinas	Inhibidores de fosfodiesterasas de cAMP, antagonistas de los receptores de adenosina	• Broncoconstricción	• Efectos colaterales en el sistema nervioso central y en el sistema cardíaco	Teofilina
Inmunomoduladores	Inhibidores de la calcineurina (inhibición de la activación de células T)	• Dermatitis atópica	• Indicado para enfermos con síntomas refractarios	Tacrolimus, ciclosporina A oral, pimecrolimus
Anticuerpo monoclonal anti-IgE	Bloqueo de los anticuerpos IgE	• Crisis asmáticas • Rinoconjuntivitis	• Elevado coste • Necesaria la hospitalización por riesgo de anafilaxia • Posiblemente asociado con el desarrollo de neoplasias malignas	Omalizumab

Poco después, Cooke *et al.* [1935] realizaron con éxito un ensayo clínico en el que demostraron que el suero de pacientes tratados mediante SIT contenía un factor que prevenía la aparición de reacciones alérgicas inmediatas en la piel. Este factor sérico resultó ser una IgG específica del alérgeno (IgG4 en humanos e IgG1 en ratón), que se denominó “anticuerpo de bloqueo”, debido a que compite con las IgEs específicas por la unión al alérgeno [Loveless, 1940].

Los primeros ensayos clínicos empleando extractos alergénicos resultaron ser poco eficaces, además de tener efectos adversos sobre la salud de los pacientes (reacciones alérgicas locales, urticaria, asma y, en algunos casos, anafilaxia). Así, los primeros intentos para solventar estos problemas se centraron en el uso de adyuvantes, como el hidróxido de aluminio [Zoss *et al.*, 1937]. De esta forma, los alérgenos se adsorben al adyuvante y una vez que el preparado es administrado, se genera una liberación sostenida de los mismos, lo que reduce la aparición de reacciones anafilácticas. Años más tarde, se realizaron los primeros intentos para disminuir la actividad alergénica de los extractos, bien mediante hidrólisis para generar un cóctel de péptidos cortos (haptenos) [Malley & Perlman, 1969], o bien por modificación química, mediante el uso de formaldehído o glutaraldehído [Marsh *et al.*, 1970]. La modificación química genera alergoides, capaces de inducir IgG de bloqueo (mantienen la inmunogenicidad) pero que exhiben una reducida reactividad IgE (alergenicidad). Hoy en día el uso de alergoides solos o adsorbidos a adyuvantes sigue siendo uno de los pilares de la SIT.

Tabla 4. Principales avances en la inmunoterapia específica.

Año	Autor/es	Avance
1.911	Noon	Primer ensayo clínico empleando SIT para el tratamiento de la “fiebre del heno”
1.935	Cooke <i>et al.</i>	Descubrimiento de la existencia de factores séricos en pacientes tratados con SIT que bloquean la reacciones alérgicas de la piel
1.937	Zoss <i>et al.</i>	Empleo del hidróxido de aluminio como adyuvante
1.940	Loveless	Descripción de los “anticuerpos de bloqueo”
1.969	Malley & Perlman	Inmunoterapia con haptenos del alérgeno
1.970	Marsh <i>et al.</i>	Modificación química de los alérgenos (alergoides) para reducir su alergenicidad
1.988	Chua <i>et al.</i>	Primera clonación del gen de un alérgeno (Der p 1)
1.996	Norman	Primer estudio clínico empleando péptidos T
2.001	Niederberger <i>et al.</i>	Primer estudio clínico empleando alérgenos recombinantes
2.004	Tulic <i>et al.</i>	Introducción del uso de alérgenos conjugados con motivos inmunoestimuladores CpG

CpG, dinucleótidos de citosina y guanina; SIT, inmunoterapia específica.

En la década de los 80, con el desarrollo de las técnicas del DNA recombinante y la caracterización molecular de las proteínas, se asentaron las bases necesarias para el conocimiento de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los alérgenos [Chua *et al.*, 1988]. Estas técnicas permitieron la producción recombinante a gran escala de los principales alérgenos, así como el diseño de derivados hipoalergénicos -cuya actividad alergénica se encuentra disminuida mientras que

mantienen su capacidad inmunogénica- [Pauli *et al.*, 1999; Valenta *et al.*, 1999; van Hage-Hamsten *et al.*, 1999]. Estas moléculas solventaron parte de la problemática asociada con el uso de extractos alérgicos naturales en inmunoterapia, tales como sensibilización *de novo* debido a la presencia de contaminantes, inestabilidad del extracto, o falta de estandarización del mismo [Valenta *et al.*, 2010]. La primera vacuna basada en alérgenos recombinantes fue administrada en pacientes alérgicos empleando dos derivados hipoalérgicos de Bet v 1, alérgeno principal del polen de abedul, hace 11 años [Niederberger *et al.*, 2004].

Hoy en día, se conoce tanto la secuencia de DNA como de aminoácidos de los alérgenos más comunes y se han determinado las estructuras tridimensionales de muchos alérgenos principales. Además, existen diversas bases de datos que contienen información sobre las secuencias y estructuras de los alérgenos más relevantes en clínica (www.allergen.org, www.allergome.org).

La inmunoterapia específica subcutánea (SCIT), o terapia de desensibilización, induce un estado de “no respuesta” -denominado tolerancia inmunológica-, en el que el sistema inmune no responde frente a una nueva exposición al alérgeno. La SCIT consiste en la administración subcutánea repetida del alérgeno o extracto alérgico en cantidades crecientes hasta un nivel máximo tolerado -generalmente de 2 a 100 µg de alérgeno mayoritario-. El protocolo de administración habitual consiste en una fase inicial en la que se incrementa la cantidad del alérgeno, seguida de una fase de mantenimiento. Los beneficios clínicos se empiezan a observar transcurridos varios meses desde el inicio de la vacunación y los síntomas de la enfermedad se reducen progresivamente durante los 3 ó 4 años que dura la terapia [Durham *et al.*, 1999; Norman, 2004]. Sin embargo, la limitada eficacia de las SCIT junto con otros inconvenientes, tales como la larga duración del tratamiento, los riesgos de reacciones anafilácticas y de nuevas sensibilizaciones frente a otras moléculas presentes en el extracto, representan un obstáculo para su uso indiscriminado [Bousquet *et al.*, 1998; Akdis, 2006]. Estos inconvenientes han planteado la necesidad de buscar nuevas estrategias más eficaces y seguras para el tratamiento, prevención y cura de esta enfermedad.

Los mecanismos por los cuales la SIT tiene los efectos desensibilizantes para las enfermedades alérgicas son muy complejos y no se conocen con exactitud, por lo que continúan siendo materia de estudio [Larché *et al.*, 2006] (**Figura 3**). Los eventos que tienen lugar durante el transcurso del tratamiento incluyen:

- I. Efectos tempranos que se relacionan con la desensibilización de los mastocitos y basófilos, lo que conlleva a una reducción de los síntomas clínicos que caracterizan la respuesta inmediata de la reacción alérgica [Eberlein-Köning *et al.*, 1995; Jutel *et al.*, 1996; Plewako *et al.*, 2006].
- II. Efectos a medio plazo por modificación de la respuesta mediada por las células Th2, ya sea por anergia, delección clonal o activación de las células T reguladoras (Treg), que producen IL-10 y/o factor de crecimiento transformante (TGF)-β (**Tabla 5**). Estos eventos van acompañados de una disminución de la secreción de citoquinas de tipo Th1 y Th2, y de la proliferación de las células Th2 [Akdis *et al.*, 1996; Akdis *et al.*, 1998; Jutel *et al.*, 2003].
- III. Efectos tardíos, asociados con la actividad de las células B. Tras el incremento transitorio de los niveles séricos de los anticuerpos IgE específicos [Gleich *et al.*, 1982; van Ree *et al.*, 1997], éstos disminuyen gradualmente, a la vez que se incrementan los niveles de IgG, particularmente de IgG4 [Jutel *et al.*, 2005; Reisinger *et al.*, 2005].

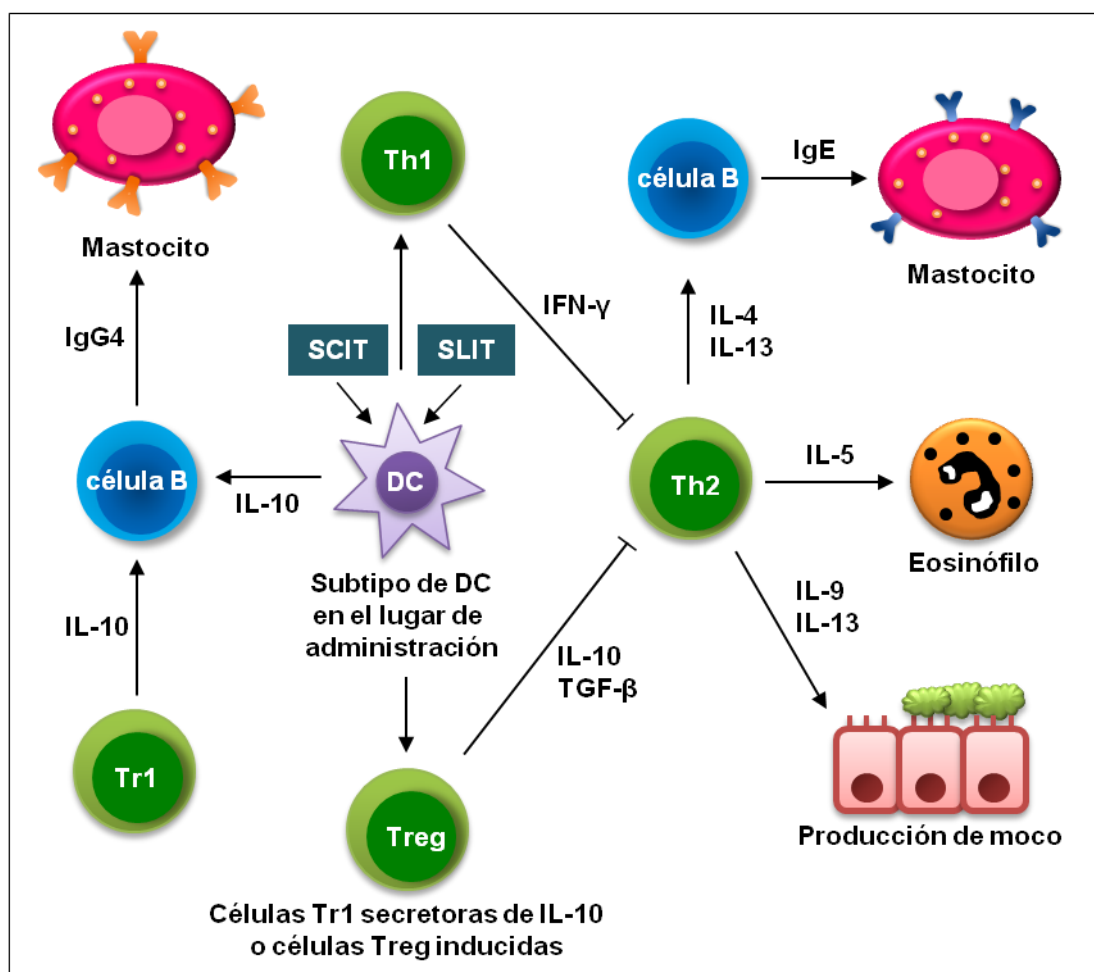


Figura 3. Mecanismo propuesto para la inmunoterapia específica. SCIT, inmunoterapia específica subcutánea; SLIT, inmunoterapia específica sublingual. Adaptado de Akkoc *et al.* [2011].

La inmunodesviación de las células Th efectoras al fenotipo Treg parece ser un evento clave en el desarrollo de una respuesta inmune “sana” al alérgeno y en la eficacia de la SIT en los pacientes [Akdis & Akdis, 2011]. Las células Treg naturales y las Treg inducibles contribuyen al control de la respuesta inmune específica del alérgeno en varios aspectos: supresión de las DCs que inducen la generación de células T efectoras; supresión de las células Th1, Th2 y Th17; supresión de IgE e inducción de IgG4; supresión de mastocitos, basófilos y eosinófilos; y supresión de la migración de las células T efectoras a los tejidos [Novak *et al.*, 2001; Akdis & Akdis, 2007; Akdis & Akdis, 2011; Akkok *et al.*, 2011].

Nuevas estrategias para la alergia

Actualmente se están realizando grandes esfuerzos tanto para el diseño de **vacunas activas**, basadas en la modificación del alérgeno, como en la búsqueda de rutas alternativas de vacunación centradas en la **inducción de tolerancia vía mucosas** [Valenta *et al.*, 2010].

Tabla 5. Principales subtipos de células T CD4⁺ reguladoras (Treg).

Célula	Naturales/Inducibles	Fenotipo	Mecanismo regulador	Referencia
nTreg	Naturales	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	IL-10, TGF-β, CTLA-4, PD-1, GITR	Sakaguchi <i>et al.</i> , 1995
Tr1	Inducibles	CD4 ⁺ CD25 ⁻	IL-10, TGF-β	Akdis <i>et al.</i> , 1998
Th3	Inducibles	CD4 ⁺ CD25 ⁻	TGF-β	Chen <i>et al.</i> , 1994

CTLA-4; antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos; GITR, proteína relacionada con el receptor del factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides; FOXP3, factor de transcripción *forkhead* caja P3; PD-1, proteína de muerte programada 1; TGF-β, factor de crecimiento transformante β.

Vacunas activas

Algunas de estas vacunas ya han sido probadas en ensayos clínicos (**Tabla 6**), mientras que otras han sido testadas en modelos animales (**Tabla 7**). Las tablas recogen algunos ejemplos de ensayos clínicos y estudios preclínicos realizados hasta la actualidad.

Inducción de tolerancia vía mucosas

La inducción de tolerancia vía mucosas representa una alternativa a la inmunoterapia convencional [Macaubas *et al.*, 2003; Wiedermann, 2005; Giudice & Campbell, 2006].

Las mucosas están formadas por una capa de epitelio y de tejido conectivo asociados a glándulas secretoras de moco. Abarcan aproximadamente de 200 a 300 m² y recubren la cara interna del tracto digestivo, respiratorio y urogenital. Dado que están en contacto con el medio exterior, las superficies mucosas representan los sitios primarios de exposición a los antígenos y, en consecuencia, están protegidas por un sistema inmune especializado y altamente desarrollado denominado tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). El MALT presenta dos funciones inmunológicamente opuestas: la inducción de inmunidad y defensa frente a patógenos, y la inducción y mantenimiento de tolerancia tanto a antígenos ambientales como a la flora bacteriana [Wiedermann, 2003; Wiedermann, 2005]. Estas características lo hacen apropiado para la administración de la SIT.

Tabla 6. Estudios clínicos empleando nuevas estrategias de vacunación.

Vacunas	Base molecular	Alérgeno/Referencias	Ventajas	Inconvenientes
Péptidos T	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos de 12 a 20 residuos de aminoácidos del alérgeno, con capacidad para unirse a TCRs específicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Api m 1 [Müller <i>et al.</i>, 1998; Tarzi <i>et al.</i>, 2006] • Fel d 1 [Norman <i>et al.</i>, 1996; Simons <i>et al.</i>, 1996; Haselden <i>et al.</i>, 1999; Oldfield <i>et al.</i>, 2001; Oldfield <i>et al.</i>, 2002; Alexander <i>et al.</i>, 2005] 	<ul style="list-style-type: none"> • Se evitan los efectos secundarios mediados por la IgE • Supresión de la inflamación mediada por las células T 	<ul style="list-style-type: none"> • Sólo se observó mejoría de los síntomas en algunos estudios • Desarrollo de efectos adversos no mediados por IgE • No se observó una reducción importante en los niveles de IgE, ni en la inflamación mediada por ésta
Hipoalérgenos recombinantes	<ul style="list-style-type: none"> • Modificación del alérgeno para que presente baja o nula alergenicidad y mantenga los epítomos T 	<ul style="list-style-type: none"> • Bet v 1 [Niederberger <i>et al.</i>, 2004; Klimek <i>et al.</i>, 2005; Reisinger <i>et al.</i>, 2005; Purohit <i>et al.</i>, 2008; Rak, 2009] 	<ul style="list-style-type: none"> • Posibilidad de seleccionar las moléculas que presentan mayor inmunogenicidad • Los pacientes presentan tolerancia a dosis elevadas de alérgeno, así como capacidad para desarrollar elevados niveles de IgG de bloqueo • Disminución evidente de los síntomas 	<ul style="list-style-type: none"> • En algunos pacientes se produjeron efectos secundarios de tipo retardado, mediado principalmente por la activación de células T
Alérgenos recombinantes	<ul style="list-style-type: none"> • No se modifica la molécula alergénica por lo que conserva las propiedades estructurales e inmunológicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Bet v 1 [Pauli <i>et al.</i>, 2008] • Phl p 1/Phl p 2/Phl p 5a/Phl p 5b/Phl p 6 [Jutel <i>et al.</i>, 2005] 	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de cócteles de alérgenos con concentraciones conocidas y controladas • Producción de mezclas dependiendo del patrón de sensibilización del paciente • No se producen sensibilizaciones <i>de novo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Mantienen su antigenicidad por lo que se puede desarrollar una respuesta IgE específica
Proteínas de fusión	<ul style="list-style-type: none"> • Fusión de los alérgenos con motivos CpG o VLPs 	<ul style="list-style-type: none"> • Amb a 1-CpG [Tulic <i>et al.</i>, 2004; Creticos <i>et al.</i>, 2006] • Der p 1-VLPs [Kündig <i>et al.</i>, 2006] 	<ul style="list-style-type: none"> • Los motivos CpG reducen la alergenicidad y favorecen una respuesta inmune Th1 específica del alérgeno 	<ul style="list-style-type: none"> • Algunos pacientes no alérgicos desarrollaron una respuesta IgG específica del alérgeno con el uso de VPLs

CpG, citosina-fosfato-guanina; TCR, receptor de células T; VPLs, partículas virus-like.

Tabla 7. Resumen de los principales estudios preclínicos empleando nuevas estrategias de vacunación.

Vacunas	Base molecular	Alérgeno	Ventajas/Inconvenientes
Alérgenos híbridos	<ul style="list-style-type: none"> • Una o más moléculas de los epítomos más relevantes de una determinada fuente alérgica • Fusión de dos o más alérgenos diferentes • Duplicados de un mismo alérgeno • Moléculas en las que se sustituye algún segmento peptídico por su equivalente no alérgico de otra molécula 	<ul style="list-style-type: none"> • OB₅₅₋₅₈ [Marazuela <i>et al.</i>, 2012] • Phl p 1-Phl p 2-Phl p 5-Phl p 6 [Linhart <i>et al.</i>, 2005] • Phl p 2-Phl p 6 [Linhart <i>et al.</i>, 2008] • Ves v 5 [King <i>et al.</i>, 2001] 	<ul style="list-style-type: none"> • Determinados tipos de alérgenos que exhiben una baja inmunogenicidad, se incrementa al formar parte de este tipo de construcciones
Terapia génica	<ul style="list-style-type: none"> • Trasplante de células madre hematopoyéticas que han sido transducidas retroviralmente para expresar alérgenos 	<ul style="list-style-type: none"> • Phl p 5 [Barayni <i>et al.</i>, 2008] 	<ul style="list-style-type: none"> • No se describieron reacciones alérgicas de ningún tipo en el estudio • Se alcanza un estado de tolerancia al alérgeno a nivel de células T y B, y de células efectoras
Haptenos y mimotopos	<ul style="list-style-type: none"> • Haptenos, moléculas que contienen un único sitio de unión a una única IgE, así no existe el entrecruzamiento de las IgEs presentes en la superficie de las células efectoras • Mimotopos, péptidos sintéticos que mimetizan epítomos del alérgeno, con capacidad de competir con él por la unión a las IgEs 	<ul style="list-style-type: none"> • Bet v 1 (mimotopo) [Ganglberger <i>et al.</i>, 2001] • Bet v 1 (hapteno) [Jahn-Schmid <i>et al.</i>, 1996] • Phl p 5 (mimotopo) [Wallman <i>et al.</i>, 2010] 	<ul style="list-style-type: none"> • Los haptenos saturan los anticuerpos IgE específicos presentes en la superficie de las células efectoras, para no se manifiesten los síntomas. Además, se pueden inducir anticuerpos IgG de bloqueo frente a dichos epítomos • Los mimotopos muestran baja inmunogenicidad y sólo una modesta afinidad por las IgE. No está muy bien establecido si realmente saturan las IgEs presentes en la superficie de las células efectoras
Péptidos B o T	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos de 12 a 40 residuos aminoácidos del alérgeno reconocidos por las células B o T específicas, respectivamente 	<ul style="list-style-type: none"> • Bet v 1 (péptido B) [Focke <i>et al.</i>, 2004] • Ole e 1 (péptido T) [Marazuela <i>et al.</i>, 2008b] • Phl p 1 (péptido B) [Focke <i>et al.</i>, 2001] • Phl p 1 (péptido T) [Edlmayr <i>et al.</i>, 2009] 	<ul style="list-style-type: none"> • Inducen la producción de anticuerpos IgG de bloqueo, impidiendo la unión de las IgE al alérgeno • Normalmente se deben acoplar a proteínas con el fin de inducir una respuesta IgG robusta
DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunización del individuo con células transfectadas con vectores de DNA que codifican para el alérgeno o péptidos derivados de éste 	<ul style="list-style-type: none"> • Ara h 2 [Roy <i>et al.</i>, 1999] • Cry j 1 [Masuda, 2005] • Bet v 1 [Weiss <i>et al.</i>, 2002; Hochreiter <i>et al.</i>, 2003] • Hev b 5 [Slater <i>et al.</i>, 1998] 	<ul style="list-style-type: none"> • El tipo de respuesta depende de la construcción del alérgeno, de su procesamiento y presentación del mismo • Se puede inducir una respuesta dependiente de células T CD8⁺, células Th1 y en algunas ocasiones células Th2 • La síntesis incontrolada del alérgeno en el individuo podría potenciar el riesgo de inducir efectos secundarios severos como un <i>shock</i> anafiláctico

Actualmente se están desarrollando vacunas para la inmunización vía mucosas hacia otros sitios distantes del organismo. Diversos estudios realizados en modelos de ratón han demostrado la eficacia de la administración vía mucosas de alérgenos, o sus derivados, en la prevención y/o tratamiento de las enfermedades alérgicas [Wiedermann, 2005; Batanero *et al.*, 2010]. Así, se ha desarrollado y validado una nueva estrategia de vacunación, la inmunoterapia sublingual (SLIT) [Bousquet, 2006]. En la SLIT, los alérgenos o extractos alérgicos son administrados, por el propio paciente, en la mucosa oral en forma de gotas, pulverizadores o tabletas liofilizadas, de forma que se depositan bajo la lengua durante 2 ó 3 minutos antes de su deglución. La elección de esta ruta se basa en el hecho de que el epitelio de la región sublingual es más fino que en otras regiones de la mucosa oral, por lo que la reabsorción de los fármacos es mayor. Además, la mucosa oral alberga una red inmunológica sofisticada que contiene, entre otras, DCs con una predisposición a establecer mecanismos tolerogénicos [Novak *et al.*, 2011] (**Figura 3**). El régimen de administración de la SLIT normalmente implica una fase inicial donde se incrementa gradualmente la dosis, seguida de una fase de mantenimiento, al igual que en la subcutánea. En los casos de polinosis, la SLIT puede ser administrada de forma preestacional (antes de la estación polínica), coestacional (durante la estación polínica), precoestacional (antes y durante la estación polínica) o continua (todo el año, independientemente de la estación polínica). La duración del tratamiento varía desde un mínimo de 3 meses hasta un máximo de tres años, con una frecuencia de administración diaria, en días alternos o una vez a la semana [Lombardi *et al.*, 2009].

Los efectos secundarios de la SLIT son menores que en la SCIT e incluyen: prurito bucal o bucolabial, sensación de ardor bucolabial, edema, dolores gastrointestinales o diarrea. Las reacciones sistémicas suelen ser poco frecuentes y no conllevan la suspensión del tratamiento, al contrario de lo que ocurre en la subcutánea [Gidaro *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005]. Estas ventajas, con respecto a la SCIT, hacen de la ruta sublingual una alternativa adecuada incluso para niños [Valovirta *et al.*, 2006; Ozdemir *et al.*, 2007]. Sin embargo, la principal desventaja de la SLIT es que se requieren grandes dosis de alérgeno: de 5 a 20 mg, lo que representa de 2 hasta 375 veces la dosis usada para la SCIT [Ewbank *et al.*, 2003; Frew *et al.*, 2006]. Además, algunos estudios han indicado que no es tan efectiva como la SCIT [Williams *et al.*, 2004].

Otra vía recientemente explorada es la rectal. Según la base de datos del NIH (*National Institutes of Health*), se está llevando a cabo un estudio en fase clínica I en el que individuos sanos reciben 4 dosis, administradas semanalmente, de una mezcla de alérgenos recombinantes de cacahuete -Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3- encapsulados en la bacteria *E. coli* inactivada térmica y químicamente [Valenta *et al.*, 2011]. Si esta vacuna rectal fuese eficaz y segura, los alérgicos al cacahuete podrían disponer de un tratamiento, ya que en la actualidad no pueden recibir ningún tipo de inmunoterapia por el elevado riesgo de reacciones anafilácticas.

Las vacunas nasales representan una alternativa prometedora por sus grandes ventajas. La vía nasal, al igual que la oral, permite una administración cómoda y sencilla de la vacuna por el propio paciente. Además, esta ruta requiere dosis mucho más bajas, siendo capaz de inducir una respuesta inmune más potente, tanto local como sistémica, que ninguna otra ruta de inmunización por vía mucosas [Kiyono & Fukuyama, 2004; Mascarell *et al.*, 2011]. Varios estudios realizados con modelos animales han observado que la administración intranasal (i.n.) de Bet v 1 o de sus derivados hipoalérgicos, era capaz de prevenir la sensibilización alérgica [Wiedermann *et al.*, 1999a; Wiedermann *et al.*, 2001].

También se ha demostrado que la administración vía i.n. de péptidos T de alérgenos procedentes de varias fuentes alérgicas como el veneno de insectos, los ácaros y el polen de olivo, inducen un estado de tolerancia frente al alérgeno [Astori *et al.*, 2000; Jarnicki *et al.*, 2001; Marazuela *et al.*, 2008b]. A pesar de las ventajas que ofrece esta ruta, pocas vacunas nasales han alcanzado el mercado, siendo tratadas con bastante precaución, en particular cuando se basan en organismos vivos.

La búsqueda de nuevos vehículos -sintéticos o biológicos- que promuevan tolerancia *versus* inmunidad vía mucosas abre la posibilidad de desarrollar vacunas más eficaces y seguras [Mascarell *et al.*, 2011]. Durante los últimos años se ha propuesto el uso de exosomas como vacunas libres de células para el tratamiento de diferentes patologías humanas, como el cáncer o la artritis reumatoide [Chaput & Théry, 2011].

LOS EXOSOMAS, DE SISTEMA DE COMUNICACIÓN CELULAR A VACUNA

Los exosomas son una subclase específica de microvesículas membranosas, secretadas por las células vivas, que participan en los procesos de comunicación intercelular [Théry *et al.*, 2006].

El término “exosoma” fue propuesto, por primera vez, a principios de los años 80 para designar a unas vesículas membranosas secretadas durante el proceso de maduración de los reticulocitos de pollo [Pan & Johnstone, 1983]. En estos estudios, se observó que el receptor de la transferrina -ausente en el eritrocito maduro- era secretado en unas vesículas de pequeño tamaño de origen endocítico. Inicialmente se pensó que la función principal de los exosomas era la eliminación de moléculas innecesarias para la célula madura, lo que motivó que el estudio de exosomas se interrumpiese durante varios años. Sin embargo, el interés por los exosomas se renovó gracias a las investigaciones de Raposo *et al.* [1996], que pusieron de manifiesto, por primera vez, la importancia de los exosomas en la respuesta inmune adaptativa. Estos estudios demostraron que las células B transformadas por el virus de Epstein-Barr (EBV) secretaban al medio de cultivo exosomas que contenían complejos MHC-II/péptido estables y funcionales, puesto que estos complejos podían ser presentados a células T específicas, activándolas. Posteriormente, los estudios con exosomas se extendieron a las DCs. Así, el grupo de la Dra. Théry demostró que los exosomas derivados de DCs eran capaces de inducir una respuesta antitumoral en un modelo de ratón [Zitvogel *et al.* 1998].

El término “microvesícula” engloba diferentes poblaciones de vesículas entre las que se encuentran los exosomas, los ectosomas y las vesículas apoptóticas [Sadallah *et al.*, 2011]. La **Tabla 8** muestra un resumen de las principales características físico-químicas de los diferentes tipos de microvesículas.

En la actualidad, no existe un consenso en cuanto a la terminología empleada para designar a los exosomas. Así, en la literatura se pueden encontrar diferentes nombres como: dexosomas o Dex, para designar a los exosomas derivados de DCs [Le Pecq, 2005]; texosomas o Tex, derivados de células tumorales [Dai *et al.*, 2008]; tolerosomas, exosomas derivados del epitelio intestinal [Karlsson *et al.*, 2001]; prostasomas, exosomas derivados de fluido seminal [Inayat *et al.*, 2012]; o argosomas, vesículas exosomas-like secretadas por células del epitelio de *Drosophila* [Greco *et al.*, 2001].

Desafortunadamente, el término “exosoma” fue reutilizado en el año 1997 para referirse a un complejo de 11 proteínas de las cuales la mayoría son exorribonucleasas 3'-5'. Este complejo está implicado en el procesamiento del RNA mensajero (mRNA) [Mitchell *et al.*, 1997].

PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DE LOS EXOSOMAS

Los exosomas son pequeñas microvesículas membranosas redondeadas, con un tamaño comprendido entre los 30 y 100 nm de diámetro, determinado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Por ejemplo, los exosomas derivados de la leche materna presentan un tamaño promedio de 50 nm [Admyre *et al.*, 2007b], mientras que los exosomas derivados de saliva humana de 40 nm [Ogawa *et al.*, 2011]. Los exosomas exhiben una densidad de flotación en gradiente de sacarosa comprendida entre 1.10 g/ml y 1.21 g/ml [Théry *et al.*, 2006].

Los exosomas presentan una bicapa lipídica que contiene diversas proteínas insertadas y, como consecuencia de su biogénesis, encierran en su lumen una pequeña porción de proteínas solubles, mRNAs y microRNAs (miRNAs), procedentes todos ellos del citosol [Chaput & Théry, 2011]. Estas microvesículas se caracterizan, además de por su tamaño, forma y densidad, por su composición molecular, como la presencia de proteínas específicas denominadas “marcadores exosomales”, entre las que se encuentran las tetraspaninas CD9 y CD63, Alix y Tsg101 [Théry *et al.*, 2009], como se comentará posteriormente.

Tabla 8. Características físico-químicas de los principales tipos de microvesículas secretadas.

	Exosomas	Microvesículas	Ectosomas	Partículas membranosas	Vesículas exosoma-like	Vesículas apoptóticas
Tamaño	30-100 nm	100-1.000 nm	50-200nm	50-80 nm	20-50 nm	50-500 nm
Densidad en sacarosa	1.10-1.21 g/ml	n.d.	n.d.	1.04-1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16-1.28 g/ml
Apariencia en TEM	Redondeada	Forma irregular y electrodensas	Estructuras redondeadas bilamelares	Redondeada	Forma irregular	Heterogénea
Sedimentación	100.000 <i>g</i>	10.000 <i>g</i>	160.000-200.000 <i>g</i>	100.000-200.000 <i>g</i>	175.000 <i>g</i>	1.200 <i>g</i> , 10.000 <i>g</i> o 100.000 <i>g</i>
Composición lipídica	<ul style="list-style-type: none"> • Enriquecidos en colesterol, ceramida y esfingomielina • Contienen <i>rafts</i> lipídicos • Exponen fosfatidilserina 	<ul style="list-style-type: none"> • Exponen fosfatidilserina 	<ul style="list-style-type: none"> • Enriquecidos en colesterol y diacilglicerol • Exponen fosfatidilserina 	n.d.	<ul style="list-style-type: none"> • No contienen <i>rafts</i> lipídicos 	n.d.
Principales proteínas marcadoras	<ul style="list-style-type: none"> • Tetraspaninas (CD9, CD63) • Alix y Tsg101 	<ul style="list-style-type: none"> • Integrinas • Selectinas • Ligando de CD40 	<ul style="list-style-type: none"> • CR1 • Enzimas proteolíticas 	<ul style="list-style-type: none"> • CD133 • No contienen CD63 	<ul style="list-style-type: none"> • TNFRI 	<ul style="list-style-type: none"> • Histonas
Origen intracelular	Endosomas	Membrana plasmática	Membrana plasmática	Membrana plasmática	n.d.	n.d.
Referencia	Théry <i>et al.</i> , 2006	Heijnen <i>et al.</i> , 1999	Gasser <i>et al.</i> , 2003	Marzesco <i>et al.</i> , 2005	Hawari <i>et al.</i> , 2004	Théry <i>et al.</i> , 2001

CR1, receptor 1 del complemento; n.d., no determinado; TEM, microscopía electrónica de transmisión; TNFRI, receptor 1 del factor de necrosis tumoral; Tsg101, proteína celular tumoral humana susceptible al gen 101.

Los estudios bioquímicos y funcionales de exosomas presentan ciertas dificultades técnicas relacionadas con el aislamiento y la purificación, entre las que destacan la posibilidad de contaminaciones cruzadas con otro tipo de microvesículas y el bajo rendimiento. Los protocolos de purificación de los exosomas se han desarrollado y optimizado en base a sus propiedades físico-químicas, tales como el pequeño tamaño y la densidad de flotación, y combinan diferentes técnicas como la centrifugación diferencial, la filtración, la concentración, la ultracentrifugación, la centrifugación en gradiente de densidad y la inmunocaptura [Chaput & Théry, 2011]. Aunque existen variaciones en función de la fuente biológica, el procedimiento clásico para la purificación de exosomas consiste en una primera etapa que engloba varias centrifugaciones diferenciales. Esta etapa permite descartar células muertas y restos celulares. Seguidamente, se procede a una filtración del sobrenadante a través de filtros de 0.22 μm , lo que reduce la contaminación con vesículas de mayor tamaño que son secretadas a partir de la membrana plasmática. Con el fin de sedimentar los exosomas, el filtrado se somete a una ultracentrifugación a 100.000 g y tras sucesivos lavados con PBS, para solubilizar posibles proteínas contaminantes, los exosomas se resuspenden en un pequeño volumen de dicho tampón. Finalmente, los exosomas pueden ser almacenados a largo plazo a -80°C , o bien a -20°C si su uso va a ser inmediato. En algunas ocasiones, los exosomas se someten a un paso adicional de purificación que consiste en una ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, con el fin eliminar posibles contaminantes como agregados proteicos o fragmentos nucleosomales procedentes de células apoptóticas [Théry *et al.*, 2006].

También se han desarrollado protocolos alternativos para el aislamiento de exosomas que emplean técnicas cromatográficas en columnas de Bio-Gel A-50 o Sepharosa 2B [Taylor *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005a], o bien técnicas de inmunocaptura que se basan en el empleo de “bolitas” magnéticas o de agarosa recubiertas de anticuerpos específicos. La inmunocaptura con anticuerpos anti-MHC-II ha sido utilizada, por ejemplo, para aislar exosomas derivados de leche materna con una elevada pureza [Admire *et al.*, 2007]. La problemática asociada con esta técnica reside en la selección de una población de exosomas definida por el anticuerpo empleado. Por último, con el fin de obtener exosomas con un grado de pureza clínico, Lamparski *et al.* [2002] han establecido un protocolo siguiendo el procedimiento de “Buenas Prácticas de Fabricación” (*Good Manufacturing Practices*), para una aplicación segura prevista en pacientes.

BIOGÉNESIS DE LOS EXOSOMAS

Durante el proceso de endocitosis, las células incorporan nutrientes y otras sustancias en vesículas endocíticas, las cuales son transportadas a los endosomas tempranos. Mediante procesos de acidificación, cambios en el contenido proteico y un aumento de la tendencia para fusionarse con otras membranas, los endosomas tempranos pasan a endosomas tardíos. Estos dos tipos de compartimentos se pueden distinguir por su forma y localización celular [Fujita *et al.*, 1990].

Los endosomas tardíos sufren un proceso de invaginación inversa de su membrana limitante, acumulándose en su interior una gran cantidad de vesículas intraluminales (ILVs), lo que resulta en la formación de los cuerpos multivesiculares (MVBs). En DCs, los MVBs constituyen el lugar de almacenamiento de las moléculas de MHC-II junto a la cadena invariante [Keller *et al.*, 2006].

Los MVBs pueden seguir dos rutas: la degradativa y la exocítica. En la ruta degradativa, la fusión de los MVBs con los lisosomas resulta en la degradación de las proteínas y lípidos presentes en ellos. De forma que esta ruta permite a la célula eliminar el exceso de membrana, así como de las proteínas presentes en estas estructuras [Futter *et al.*, 1996; Mullock *et al.*, 1998]. En la ruta exocítica, los MVBs se fusionan con la membrana plasmática para liberar las ILVs al medio extracelular, las cuales pasan a denominarse **exosomas** [van Deurs *et al.*, 1993; Gruenberg & Maxfield, 1995]. En la **Figura 4** se muestra la biogénesis de los exosomas en comparación con la de los ectosomas y las vesículas apoptóticas.

La biogénesis de los exosomas determina la orientación de su membrana, de forma que sus proteínas tienen la misma orientación que en la membrana plasmática. Sin embargo, está invertida en comparación con otros tipos de procesos de invaginación que ocurren en las células, como han sugerido diferentes estudios [Denzer *et al.*, 2000; Simons & Raposo, 2009]. Por otra parte, la comparación de la membrana de los exosomas con la membrana plasmática de la célula de la cual derivan permite concluir que no son simples fragmentos de ésta. A diferencia de otros tipos de microvesículas, los exosomas carecen de ciertas proteínas muy abundantes en la membrana plasmática. Por ejemplo, se ha observado que los exosomas derivados de DCs carecen del receptor FcγRII/III [Théry *et al.*, 2001], los derivados de células T no presentan CD28 ni CD45 [Blanchard *et al.*, 2002] y a los derivados de células B les falta el receptor de la transferrina [Raposo *et al.*, 1996].

Actualmente se sabe muy poco sobre la maquinaria celular que está implicada en la fusión de los MVBs con la membrana plasmática. Diversos estudios han observado que son pequeñas GTPasas, como los receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible a N-etilmaleimida (*SNAREs*) o de tipo Rab (p. ej., Rab11 y Rab27), podrían ejercer un papel importante en el transporte y/o fusión de los MVBs con la membrana plasmática [Andrews & Chakrabarti, 2005; Stinchcombe & Griffiths, 2007; Hsu *et al.*, 2010; Ostrowski *et al.*, 2010]. Además, se ha demostrado la participación en estos procesos de las enzimas diacilglicerol quinasa y citrón quinasa en células T, [Alonso *et al.*, 2005; Loomis *et al.*, 2006] y de la proteína BIG2 en células endoteliales [Islam *et al.*, 2007].

Los exosomas son secretados al medio extracelular tanto por líneas celulares establecidas como por cultivos primarios, incluyendo: células epiteliales intestinales [van Niel *et al.*, 2001] y traqueobronquiales [Kesimer *et al.*, 2009], células madre mesenquimales [Lai *et al.*, 2010], fibroblastos [Zhang *et al.*, 2006], reticulocitos [Johnstone *et al.*, 1987], mastocitos [Laulagnier *et al.*, 2004], plaquetas [Cocucci *et al.*, 2009], DCs [Segura *et al.*, 2005a; Segura *et al.*, 2005b; Chaput *et al.*, 2006], células T [Turiák *et al.*, 2011], células B [Vallhov *et al.*, 2011], queratinocitos [Chavez-Muñoz *et al.*, 2008], células de la glía [Fevrier *et al.*, 2004] y microglía [Potolicchio *et al.*, 2005], neuronas [Fauré *et al.*, 2006], astrocitos [Graner *et al.*, 2009] y numerosas líneas de células tumorales [Wolfers *et al.*, 2001; Hegmans *et al.*, 2004; Abusamra *et al.*, 2005]. Los exosomas también se han descrito en diversos fluidos biológicos tales como: suero [Caby *et al.*, 2005; Looze *et al.*, 2010], fluido broncoalveolar (BALF, *Bronchoalveolar Lavage Fluid*) [Admyre *et al.*, 2003], orina [Conde-Vancells *et al.*, 2010], efusiones tumorales [André *et al.*, 2002], esperma [Poliakov *et al.*, 2009], fluido amniótico [Asea *et al.*, 2008], saliva [Ogawa *et al.*, 2011], leche materna [Admyre *et al.*, 2007b] y calostro [Hata *et al.*, 2010].

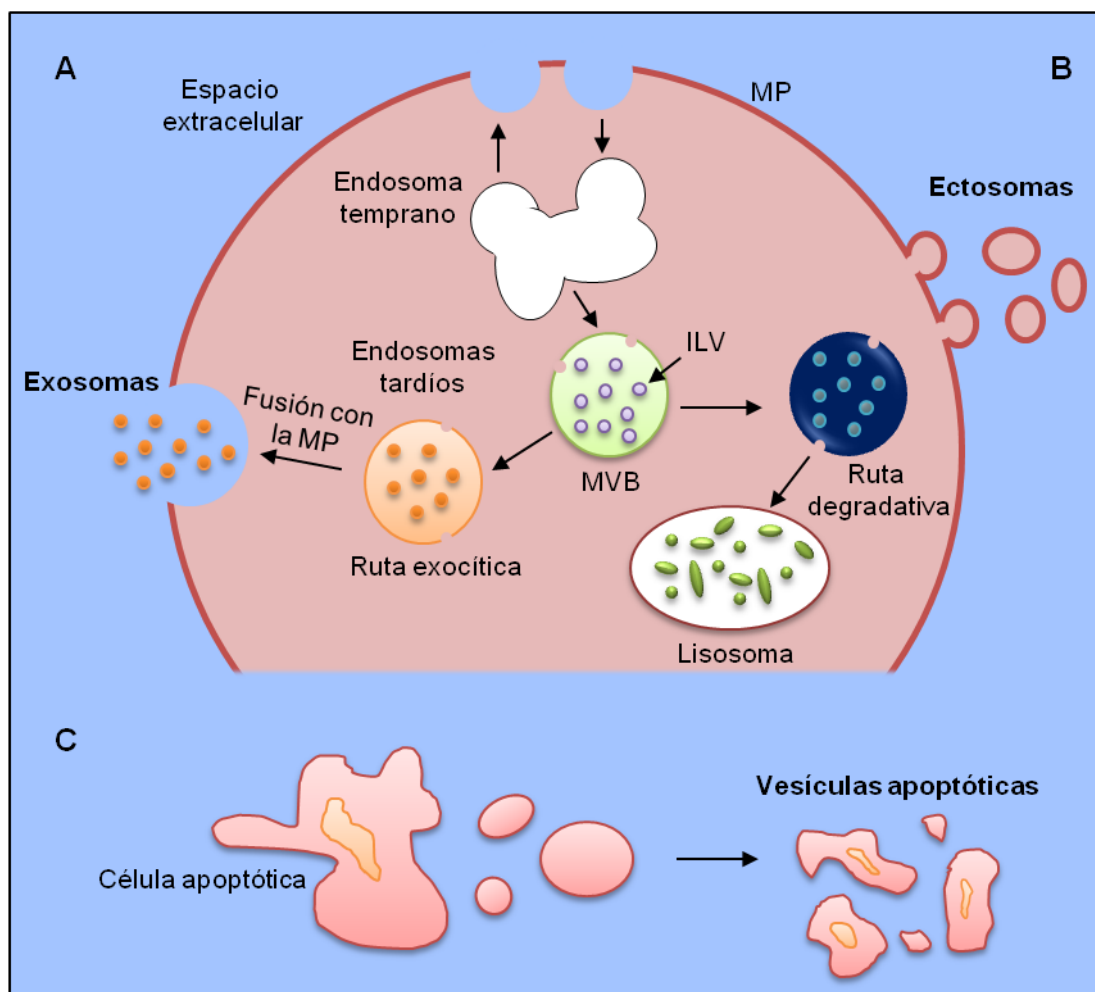


Figura 4. Representación esquemática de la biogénesis y secreción de los tres tipos principales de microvesículas. (A) Exosomas, (B) ectosomas y (C) vesículas apoptóticas. ILV, vesículas intraluminales; MP, membrana plasmática; MVB, cuerpo multivesicular. Adaptado de Mathivanan *et al.* [2010].

La secreción de los exosomas puede ser tanto constitutiva como regulada por diferentes estímulos internos, entre ellos el aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular [Stoorvogel *et al.*, 2002]. La secreción de exosomas también puede ser estimulada de forma exógena mediante promotores del estrés celular (p. ej., choque térmico o radiaciones UV) [Yu *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2007] y fármacos, tales como ionóforos de calcio [Fauré *et al.*, 2006; Krämer-Albers *et al.*, 2007], agentes secuestradores de colesterol o inhibidores de su síntesis [Keller *et al.*, 2007; Stoeck *et al.*, 2006].

La mayor parte de los estudios con exosomas se han llevado a cabo con células de mamíferos. Sin embargo, este tipo de microvesículas han sido descritas en otras especies tales como: reticulocitos de aves, donde se observaron por primera vez [Pan & Johnstone, 1983]; leucocitos de salmón [Iliev *et al.*, 2010]; parásitos intracelulares como *Leishmania major* [Silverman *et al.*, 2010] y tripanosomas [Clayton & Estevez, 2011]; veneno de serpiente [Ogawa *et al.*, 2008]; *Drosophila* [Greco *et al.*, 2001]; hongos [Nosanchuk *et al.*, 2008; Micali *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011]; e incluso en bacterias [Nevot *et al.*, 2006]. Hasta la fecha, sólo un estudio ha demostrado la presencia de estructuras similares a exosomas en plantas, concretamente, en el fluido apoplástico de semillas de girasol [Regente *et al.*,

2009; Regente *et al.*, 2012], aunque existen evidencias de que dichas microvesículas podrían estar implicadas en la respuesta de defensa de la planta frente a hongos [An *et al.*, 2006; An *et al.*, 2007; Nosanchuk *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2012].

Por último, pocos estudios se han llevado a cabo sobre la interacción de los exosomas con la célula receptora. Los resultados obtenidos han permitido proponer cuatro mecanismos de interacción posibles: (I) endocitosis mediada por receptor [Morelli *et al.*, 2004], (II) adhesión a la superficie celular [Segura *et al.*, 2007; Al-Nedawi *et al.*, 2009; Nolte-'t Hoen *et al.*, 2009; Escrevente *et al.*, 2011], (III) fusión con la membrana plasmática [Parolini *et al.*, 2009] y (IV) fagocitosis [Feng *et al.*, 2010].

COMPOSICIÓN MOLECULAR

El contenido proteico de los exosomas se ha estudiado mediante diversas técnicas, como inmunodetección con anticuerpos específicos, citometría de flujo e inmunolocalización. Sin embargo, los estudios de espectrometría de masas han permitido identificar proteínas que no habían sido descritas anteriormente como componentes de los exosomas [Mathivanan *et al.*, 2010].

La composición de proteínas de los exosomas varía dependiendo del tipo de célula que los origina, así como del estado fisiológico de la misma [Stoorvogel *et al.*, 2002; Chaput & Théry, 2011]. Así, los exosomas derivados de células B expresan el receptor de las células B (BCR) [Rialland *et al.*, 2006] y se enriquecen en proteínas de choque térmico tras estrés térmico [Clayton *et al.*, 2005]. Por otra parte, los exosomas secretados por DCs expresan CD11c [Kim *et al.*, 2007] y, tras su activación, se enriquecen en MHC-II, CD86 y en la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) [van Niel *et al.*, 2003]. Sin embargo, independientemente de la célula que los origina, los exosomas comparten un conjunto de proteínas que son consideradas como “marcadores exosomales” [Mathivanan *et al.*, 2010] (**Figura 5**). Entre estos marcadores podemos destacar: proteínas implicadas en la biogénesis de los MVBs, como Alix, clatrina y Tsg101; tetraspaninas (p. ej., CD9, CD63 y CD81), que constituyen una de las familias más abundantes en los exosomas; y proteínas de choque térmico (hsp) que están implicadas en la presentación de antígenos, tales como hsp60, hsc70, hsp70 y hsp90. Frecuentemente se detectan otras proteínas tales como: proteínas de la familia de las inmunoglobulinas, por ejemplo, ICAM-1; proteínas asociadas a *rafts* lipídicos, como flotilina-1; proteínas implicadas en el tráfico celular (p. ej., anexinas, syntaxina, dinamina y proteínas Rab); enzimas metabólicas (p. ej., enolasa, aldolasa, ATP citrato liasa, ácido graso sintasa); proteínas implicadas en la transducción de señales, como quinasas y fosfatasas; y proteínas del citoesqueleto, tales como actina, tubulina, moesina y vimentina. Otras proteínas detectadas en los exosomas son ATPasas, albúmina, histonas y factores de transcripción (FT) [Mathivanan *et al.*, 2010; Chaput & Théry, 2011].

Los exosomas derivados de APCs presentan, además, moléculas implicadas en la presentación de antígenos, tales como MHC-I y/o MHC-II, y moléculas coestimuladoras, como CD80 y CD86 [Mathivanan *et al.*, 2010; Chaput & Théry, 2011].

El mecanismo de direccionamiento de las proteínas hacia los MVBs no se conoce con exactitud. Varios mecanismos parecen estar implicados, entre ellos: el complejo de clasificación endosomal requeridos para el transporte (*ESCRT*), que reconoce señales de ubiquitinización; la agregación de las

proteínas en oligómeros; y la presencia de proteínas en *rafts* lipídicos [Vidal *et al.*, 1997; de Gassart *et al.*, 2003].

En comparación con la gran cantidad de estudios llevados a cabo para dilucidar el proteoma, son pocos los trabajos realizados sobre el contenido lipídico de los exosomas. Los exosomas presentan *rafts* lipídicos, están enriquecidos en esfingomiélin, colesterol y ceramida, y exponen en la cara externa de la bicapa fosfatidilserina -lípidos que se encuentran normalmente en la cara citoplasmática de la membrana plasmática- [de Gassart *et al.*, 2003; Wubbolts *et al.*, 2003; Laulagnier *et al.*, 2004; Morelli *et al.*, 2004; Parolini *et al.*, 2009]. Aunque estos estudios señalan que los exosomas presentan un enriquecimiento en ciertos lípidos en relación con la célula que los secreta, otros sugieren que la composición lipídica de los exosomas es similar a la de la membrana plasmática de la célula de origen [Vidal *et al.*, 1989]. Poca atención se ha prestado también a la glicosilación de los exosomas [Keller *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2011; Escrevente *et al.*, 2011]. Recientemente, Batista *et al.* [2011] han descrito un patrón de glicosilación conservado para los exosomas de varias líneas celulares humanas (células T, células de melanoma y de cáncer de colon) y de leche materna. Este patrón se caracteriza por un enriquecimiento en N-glicanos de tipo “complejo” y “ricos en manosa”, $\alpha(2,6)$ ácido siálico y polilactosamina, así como por la ausencia de los antígenos de los grupos sanguíneos A y B. Estos autores sugieren un papel de la glicosilación en el direccionamiento de las proteínas a los exosomas.

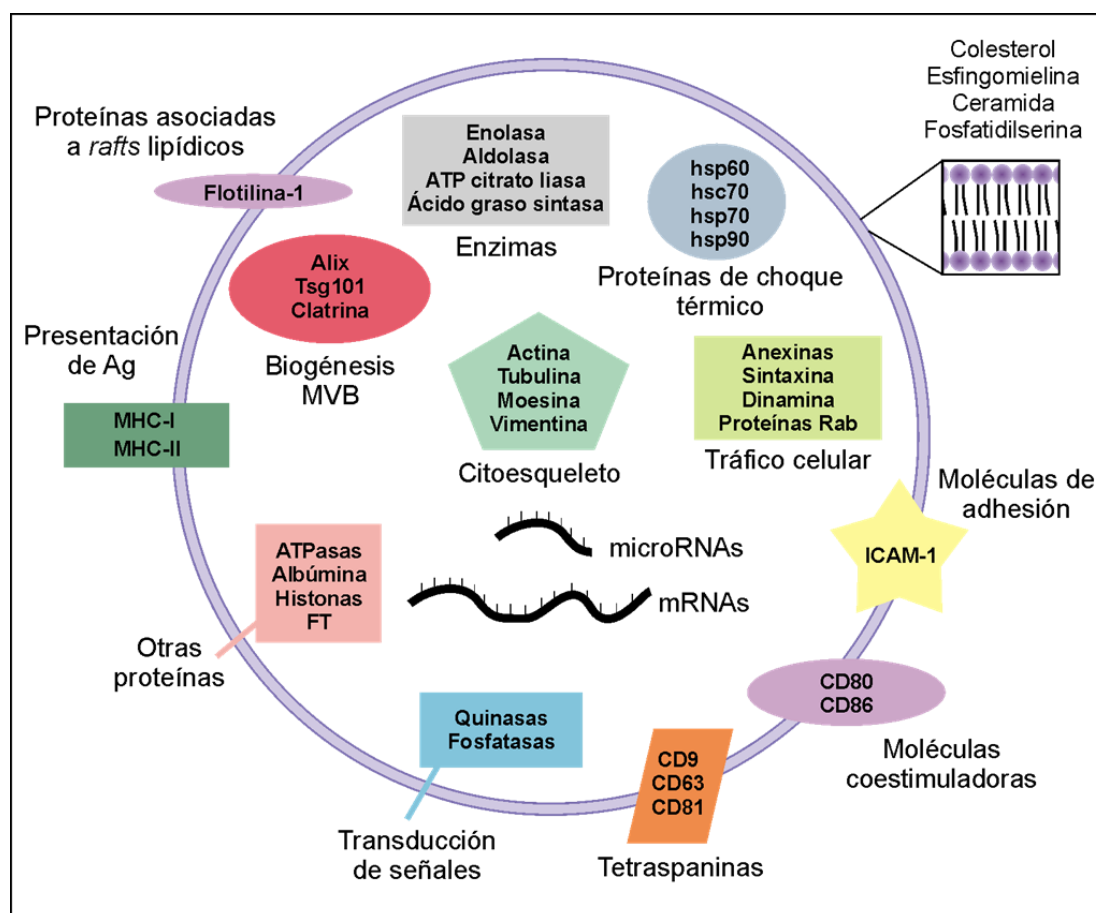


Figura 5. Representación esquemática de la composición molecular de un exosoma “canónico”. Adaptado de Mathivanan *et al.* [2010]. Las proteínas se han clasificado según su función. Ag, antígeno; FT, factores de transcripción; MVBs, cuerpos multivesiculares.

Por último, Valadi *et al.* [2007] demostraron, mediante un elegante estudio, la presencia de mRNAs y miRNAs en los exosomas secretados por mastocitos de ratón y de humano. Estos RNAs eran biológicamente activos, puesto que conferirían nuevas funciones a las células receptoras tras su captura. Más tarde, Skog *et al.*, [2008] confirmaron su presencia en los exosomas secretados por una línea celular de glioblastoma humano. Ambos estudios pusieron de manifiesto la capacidad de los exosomas de llevar a cabo la transferencia horizontal de material genético. Este descubrimiento ha potenciado el interés por los exosomas en los últimos años. Hasta la fecha se han determinado los transcriptomas de exosomas de diferentes fuentes, por ejemplo, de células de páncreas [Nazarenko *et al.*, 2010], neuronas [Bellingham *et al.*, 2012], monocitos [Gibbins *et al.*, 2009], células B [Pegtel *et al.*, 2010], células T y DCs [Mittelbrunn *et al.*, 2011], suero [Rabinowits *et al.*, 2009] y saliva [Palanisamy *et al.*, 2010]. Los datos obtenidos sugieren un mecanismo de direccionamiento para este tipo de moléculas ya que los exosomas se encuentran enriquecidos en determinados RNAs, dependiendo de su origen celular.

La necesidad de recopilar la información obtenida en los estudios sobre la composición de proteínas, lípidos y RNAs en los exosomas de diferentes fuentes, ha llevado a la creación de la base de datos *ExoCarta* (www.exocarta.org) [Mathivanan & Simpson, 2009]. Hasta la fecha, se han incluido en dicha base los datos de 135 artículos publicados en revistas indexadas, dando lugar a un total de 4.520 entradas de proteínas, 194 entradas de lípidos, 1.639 entradas de mRNAs y 764 entradas de miRNAs. Estas moléculas han sido identificadas mediante diferentes métodos.

El hecho de que la composición de los exosomas (proteínas, lípidos, mRNAs y miRNAs) sea un reflejo del tipo y del estado fisiológico de la célula de la que derivan, los ha llevado a proponer como biomarcadores para el diagnóstico de varias enfermedades humanas [Chaput & Théry, 2011; Pant *et al.*, 2012]. Así, varios estudios proteómicos han detectado la presencia de marcadores tumorales en exosomas derivados de orina de pacientes con cáncer de próstata, como PCA3 y PSA [Mitchell *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2009], o de vejiga, como la subunidad α de la proteína de unión a GsGTP [Smalley *et al.*, 2008]. Además, determinados miRNAs también han sido descritos como marcadores de diagnóstico y pronóstico de enfermedades en humanos. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de los marcadores de cáncer de ovario miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 y miR-214, en los exosomas derivados del plasma de pacientes [Taylor & Gercel-Taylor, 2008].

FUNCIONES DE LOS EXOSOMAS EN EL SISTEMA INMUNE

El hallazgo de que los exosomas portan tanto antígenos como complejos estables MHC/péptido ha despertado el interés de los inmunólogos por su posible papel en la respuesta inmune [Chaput & Théry, 2011].

Funciones de los exosomas *in vitro*

Los exosomas pueden llevar en su superficie complejos estables MHC/péptido que en determinadas ocasiones pueden ser presentados a células T específicas. Varios estudios han demostrado que los exosomas derivados de APCs, previamente pulsadas con péptidos, contienen complejos estables MHC-II/péptido [Segura *et al.*, 2005a; Théry *et al.*, 2009]. Estos estudios han indicado que dichos complejos son funcionales, ya que son capaces de activar células T CD4⁺ en presencia de APCs deficientes en MHC-II. También se ha demostrado que exosomas derivados de DCs, que

expresan complejos MHC-I/péptido, son capaces de activar clones de células T CD8⁺, tanto en ausencia como en presencia de DCs que expresan complejos MHC-I alogénicos [Hsu *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2005; Admyre *et al.*, 2006].

Los exosomas secretados por células tumorales, así como los derivados de líquido ascítico de pacientes con cáncer, contienen antígenos tumorales, tales como ERBB2, MART1 o gp100 [Wolfers *et al.*, 2001; André *et al.*, 2002; Napoletano *et al.*, 2009]. Estos exosomas son capaces de activar células T CD4⁺ o CD8⁺ específicas a través de DCs que no han tenido contacto con el antígeno. Además, los exosomas derivados de macrófagos infectados con las bacterias *Mycobacterium tuberculosis* o *M. bovis*, contienen antígenos derivados de dichos patógenos [Giri & Schorey, 2008], mientras que los exosomas derivados de células endoteliales infectadas con citomegalovirus son capaces de transferir antígenos derivados del virus a DCs para activar a células CD4⁺ [Walker *et al.*, 2009].

Además de moléculas de MHC, los exosomas contienen una gran cantidad de proteínas que pueden inhibir la respuesta inmune mediante diferentes mecanismos independientes de antígeno [Chaput & Théry, 2011]. Así, los exosomas derivados de varias líneas tumorales son capaces de inducir la apoptosis de células T, tanto CD4⁺ como CD8⁺, a través de los ligandos FasL y TRAIL [Andreola *et al.*, 2002; Czystowska *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2011], y de la galectina-9 [Klibi *et al.*, 2009]. Los exosomas derivados de la leche materna y del calostro son capaces de inhibir la activación de células T CD4⁺ o CD8⁺ *in vitro*, posiblemente a través de la expresión en superficie de TGF-β [Admyre *et al.*, 2007b]. Por último, los exosomas derivados de la placenta reducen la citotoxicidad de las células NK y CD8⁺, probablemente a través de los ligandos de NKG2 que expresan [Hedlund *et al.*, 2009].

Bajo determinadas circunstancias, los exosomas pueden tener funciones activadoras del sistema inmune [Chaput & Théry, 2011]. Así, los exosomas derivados de macrófagos infectados con patógenos son capaces de inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias por macrófagos que no han tenido contacto previo con dicho patógeno [Bhatnagar *et al.*, 2007]. Además, se ha descrito una actividad inmunoestimuladora en exosomas derivados de tumores, generalmente cuando las células tumorales han sido expuestas a condiciones de estrés [Gastpar *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2008]. La capacidad inmunoestimuladora también ha sido documentada en exosomas derivados de fluidos biológicos como el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide [Zhang *et al.*, 2006] y el BALF de pacientes con sarcoidosis [Qazi *et al.*, 2010].

Funciones de los exosomas *in vivo*

De forma similar a los hallazgos *in vitro*, numerosos estudios preclínicos han demostrado que los exosomas tienen efectos pleiotrópicos en las células del sistema inmune *in vivo*, ya que son capaces de activar o inhibir una respuesta inmune.

En relación con las propiedades inmunoestimuladoras, los exosomas derivados de DCs pulsadas *in vitro* con antígenos o péptidos derivados del protozoo *Toxoplasma gondii* son capaces de estimular tanto células Th1 como células B, generando una respuesta protectora frente a un nuevo ataque del parásito [Beauvillain *et al.*, 2007; Qazi *et al.*, 2009]. Por otro lado, se ha visto que los exosomas secretados por el protozoo *Leishmania donovani* tienen la capacidad de alterar el sistema inmune del huésped, promoviendo el crecimiento del parásito [Silverman *et al.*, 2010]. En el caso de los exosomas

secretados por hongos, éstos tienen la capacidad de aumentar tanto la captura como la secreción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, alterando de esta forma la progresión de la infección [Oliveira *et al.*, 2010].

Diversos estudios han demostrado que los exosomas derivados de DCs inmaduras promueven la supervivencia de trasplantes [Aline *et al.*, 2004] y reducen la inflamación en un modelo de shock séptico [Pêche *et al.*, 2003]. También, los exosomas derivados de DCs, que expresan CD95 o IL-10, reducen la inflamación en un modelo de artritis reumatoide [Kim *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2006]. Finalmente, los tolerosomas derivados de células epiteliales intestinales pulsadas con ovoalbúmina (OVA), o aisladas del suero de ratas tratadas vía oral con OVA, presentan propiedades inmunosupresoras [Karlsson *et al.*, 2001]. En dicho estudio se demostró que las microvesículas eran capaces de prevenir la sensibilización a OVA. Sin embargo, otros estudios sugieren que los exosomas derivados de células epiteliales intestinales expuestas a OVA inducen una respuesta efectora y no tolerogénica frente a dicho antígeno [van Niel *et al.*, 2003].

El tipo de respuesta inmune inducida *in vivo* por los exosomas derivados células tumorales es contradictorio. Así, varios estudios han observado que los exosomas pueden promover una respuesta inmune antitumoral [Dai *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2006b; Cho *et al.*, 2009], mientras que otros han sugerido que favorecen la progresión del tumor [Liu *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010]. La discrepancia observada en los resultados obtenidos por diferentes grupos podría estar relacionada con el diseño de la metodología empleada: la ruta de administración de los exosomas, la dosis del antígeno y/o el entorno *in vivo*. Estas consideraciones son especialmente importantes en el diseño de estrategias terapéuticas basadas en exosomas.

Hasta la fecha, pocos estudios han mostrado el papel de los exosomas en la alergia. En un estudio realizado por el grupo de la Dra. Gabrielsson, se demostró que los exosomas derivados de células B de pacientes alérgicos a abedul eran capaces de presentar péptidos derivados del antígeno e inducir tanto la proliferación de células Th2 como la secreción de IL-5 e IL-13. Estos resultados sugerían que los exosomas podrían jugar un papel en la reacción alérgica [Admyre *et al.*, 2007a; Admyre *et al.*, 2008]. El mismo grupo ha demostrado, recientemente, que los exosomas presentes en el BALF de pacientes asmáticos podrían contribuir a la inflamación de las vías respiratorias [Torregrosa-Paredes *et al.*, 2012]. En dicho estudio se observó que los exosomas eran capaces de promover la secreción *in vitro* de IL-8 y leucotrienos por células epiteliales bronquiales. En relación con las propiedades tolerogénicas de los exosomas en la alergia, un estudio ha demostrado que los tolerosomas aislados del suero de ratones tratados vía oral con OVA eran capaces de prevenir la sensibilización en un modelo de ratón [Almqvist *et al.*, 2008].

A pesar de los numerosos estudios realizados no se sabe cuál es el significado fisiológico de los exosomas *in vivo*. Sin embargo, todos los estudios sugieren que la naturaleza de la respuesta inmune inducida depende de su composición molecular, que es un reflejo del tipo y estado de la célula que los origina. La determinación del proteoma de los exosomas secretados por un determinado tipo de célula en diferentes condiciones fisiológicas podría ayudar a resolver este interrogante.

OTRAS FUNCIONES

Varios estudios han señalado el inesperado papel de los exosomas en la propagación de determinadas enfermedades neurodegenerativas. Porto-Carreiro *et al.* [2005] demostraron que las células liberaban la proteína priónica PrP, en sus diferentes conformaciones, en asociación con exosomas. Este mecanismo podría contribuir a la propagación de los priones, facilitando la transmisión de la enfermedad neurodegenerativa de la que son responsables. En esta misma línea, en los exosomas derivados de células neuronales se ha detectado el péptido β -amiloide, cuyos agregados son responsables de la enfermedad de Alzheimer, lo que podría estar asociado con la propagación de la enfermedad [Rajendran *et al.*, 2006].

Los exosomas también participan en otros procesos biológicos como la fertilización y el desarrollo embrionario. Así, los prostasomas parecen jugar un papel importante en la protección del espermatozoide frente al pH ácido de la vagina, aumentando la motilidad del espermatozoide y retrasando la reacción del acrosoma [Kravets *et al.*, 2000]. En *Drosophila* el desarrollo de los tejidos depende de un gradiente de distribución de morfógenos como Wingless y Hedgehog. El estudio de estos morfógenos reveló que se encontraban asociados a argosomas [Greco *et al.*, 2001; Entchev & González-Gaitán, 2002].

Numerosos estudios han revelado la habilidad de determinados virus para utilizar la maquinaria endosomal para ser secretados a través de la membrana plasmática vía exosomas, lo que representaría una forma de evasión del sistema inmune [Izquierdo-Useros *et al.*, 2011; Novellino *et al.*, 2012; Wurdinger *et al.*, 2012]. Así, las partículas virales del VIH pueden ensamblarse en los MVBs de macrófagos, acumulándose en su interior junto con los exosomas, de forma que tras la fusión de los MVBs con la membrana plasmática, se liberan las partículas infecciosas [Nguyen *et al.*, 2003; Lenassi *et al.*, 2010; Izquierdo-Useros *et al.*, 2011]. La relación entre la evolución de los retrovirus y la biogénesis de los exosomas se conoce como “hipótesis del exosoma troyano” [Pelchen-Matthews *et al.*, 2004].

LOS EXOSOMAS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

Los estudios pioneros realizados por Zitvogel *et al.* [1998] impulsaron las investigaciones del uso de exosomas como agentes terapéuticos como alternativa a las terapias basadas en DCs. Actualmente, se han completado tres ensayos clínicos en fase I empleando vacunas basadas en exosomas para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres, no operables y en estadios avanzados (estadio III y IV). Así, en el año 2005 se publicaron los resultados obtenidos en los estudios clínicos realizados en Francia [Escudier *et al.* 2005] y en EEUU [Morse *et al.* 2005], en los que se emplearon exosomas derivados de DCs para tratar pacientes con melanoma y carcinoma de pulmón, respectivamente. El tercer estudio se realizó en China, empleando como vacuna exosomas derivados de ascitis de pacientes con cáncer colorrectal, en combinación con GM-CFS [Dai *et al.*, 2008]. A pesar de que los estudios se realizaron en pacientes con cánceres avanzados que no respondían a la terapia convencional, los datos obtenidos han demostrado que la terapia basada en exosomas es eficaz. Sobre todo cuando el objetivo perseguido es prolongar la vida del paciente tras la quimioterapia o la radioterapia, más que curar al paciente.

En el año 2010, se inició en Francia un ensayo clínico en fase II en pacientes con carcinoma de pulmón no operable, en fase avanzada y estabilizados tras la inmunoterapia. En dicho ensayo se está empleando como vacuna exosomas derivados de DCs tratadas con interferón (IFN)- γ , en combinación

con tratamientos que inhiben las células Treg [Viaud *et al.*, 2009]. El objetivo de este estudio, que finalizó en diciembre de 2012 y cuyos resultados no se han publicado hasta la fecha, es aumentar la supervivencia media del paciente. Al mismo tiempo, proporcionará más datos sobre la eficacia y seguridad de la vacuna basada en exosomas para el tratamiento del cáncer.

Por otra parte, las propiedades tolerogénicas de los exosomas podrían utilizarse para tratar patologías que resulten de una respuesta inmune exacerbada como son las alergias, los rechazos de trasplantes y la artritis reumatoide. En Alemania, el grupo del Dr. Wheling está llevando a cabo un ensayo clínico en fase I, en el que se está evaluando la eficacia de una vacuna basada en exosomas para el tratamiento de la artritis reumatoide en 66 pacientes [Yang & Robbins, 2012].

EL POLEN DE OLIVO COMO MODELO EXPERIMENTAL

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol perenne de la familia *Oleaceae* que constituye un bien apreciado por el hombre por el interés económico de sus frutos (aceitunas), madera y aceite (**Figura 6**). Se cree que es originario de la antigua Mesopotamia (actualmente las naciones de Irán y Siria), aunque existen referencias históricas de su cultivo en la mayoría de las culturas de Oriente Medio y del Mediterráneo Oriental. Hoy en día, el cultivo del olivo se ha extendido a la mayor parte del área mediterránea y a otras zonas donde el clima lo permite, como el oeste de EEUU, América del Sur, Australia, el sur de África y Japón (**Figura 6B**).

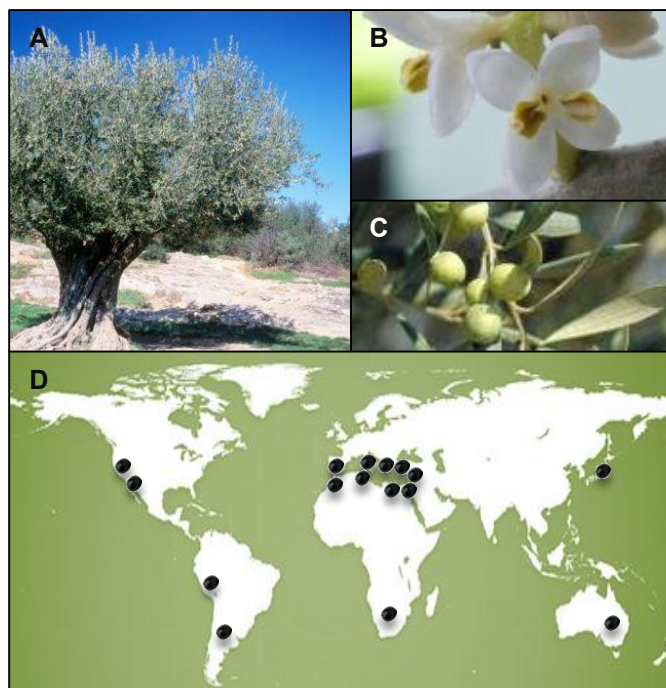


Figura 6. El olivo (*Olea europaea*) y su cultivo. (A) Olivo. (B) Detalle de la flor, (C) hojas y frutos. (D) Distribución geográfica de los principales cultivares de olivo en el mundo.

El olivo procede del acebuche u olivo silvestre (*Olea oleaster*), el cual tiene porte arbustivo y presencia de espinas en sus ramas. Además, sus hojas y frutos son más pequeños que los del olivo cultivado y sólo cuando es injertado adquiere el porte típico de árbol. En España existen diferentes variedades de olivo, entre las que destacan picual, cornicabra, hojiblanca, manzanilla, arbequina, verdial y picudo.

La familia *Oleaceae* comprende 29 géneros y hasta 600 especies, incluyendo tanto árboles de interés económico, como el fresno (*Fraxinus excelsior*) por su madera, y arbustos empleados en jardinería y ornamentación, como los jazmines (género *Jasminum*), el aligustre (*Ligustrum vulgare*) o el lilo común (*Syringa vulgaris*).

EL GRANO DE POLEN DE OLIVO

El grano de polen, o gametófito masculino, del olivo tiene una forma ligeramente elíptica y es tricolporado e isopolar. Su diámetro está comprendido entre 17 y 21 μm (**Figura 7**). Dentro del grano se encuentran las células vegetativa y generativa. La célula vegetativa contiene el núcleo vegetativo y es la responsable del crecimiento del tubo polínico. La célula generativa, implicada en la fertilización, contiene el núcleo generativo y los gametos masculinos. Para proteger el material genético del entorno, el polen se rodea de una gruesa capa llamada esporodermis, en la que se pueden distinguir dos partes: la intina y la exina. La intina o capa interna que envuelve a las células es delicada y poco resistente. Esta capa está compuesta por celulosa, pectina, polisacáridos y proteínas. Además, presenta un engrosamiento formado por calosa a la altura de la apertura por la que emergerá el tubo polínico. La exina o capa externa es gruesa, dura y presenta unos surcos y relieves característicos que le confieren un aspecto superficial muy reticulado. La exina está compuesta por esporopolenina (politerpeno resistente a la degradación) y en ella se encuentran las tres aperturas (o cólporos) del grano de polen, por una de las cuales emergerá el tubo polínico.

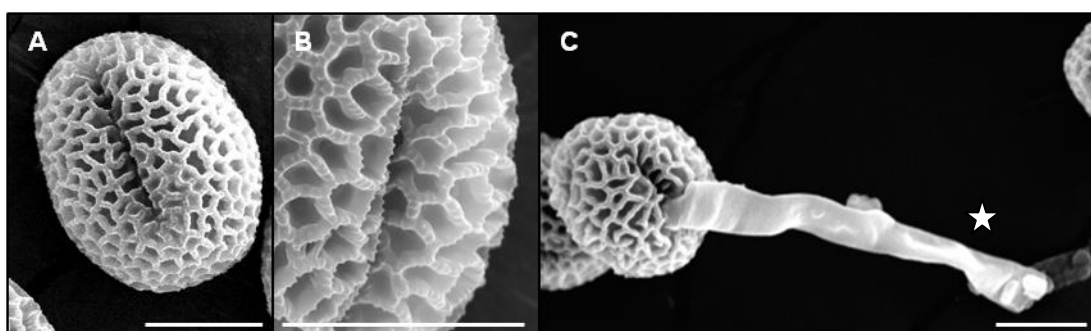


Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido del grano del polen de olivo. (A) Grano de polen de olivo quiescente, **(B)** detalle de la exina reticulada y **(C)** grano germinado. Nótese la emergencia del tubo polínico (estrella). Las barras representan 10 μm .

Una vez que el grano de polen entra en contacto con un estigma compatible tiene lugar el proceso de germinación que comienza con la hidratación y activación metabólica del grano. El proceso continúa con la emergencia y crecimiento del tubo polínico, y culmina con la fecundación. El estigma de

la flor presenta unas condiciones de salinidad, pH, temperatura y humedad óptimas para que el grano de polen de olivo germine. Dichas condiciones pueden ser reproducidas *in vitro* [Alché *et al.*, 2004].

La polinización del olivo es anemófila y los estigmas de las flores están adaptados tanto para la autopolinización como para la polinización cruzada. Este tipo de polinización requiere la producción de grandes cantidades de polen compatible para que se produzca con éxito la fecundación. La polinización del olivo tiene lugar entre los meses de abril y junio, dependiendo de las condiciones ambientales. Aunque se pueden dar casos esporádicos de aparición de polen en la atmósfera en verano y otoño. En general, la concentración media atmosférica de granos de polen oscila entre los 100-200 granos/m³, pudiendo alcanzar los 3.000-4.000 granos/m³ de forma continuada durante los periodos de producción elevada de polen [Subiza *et al.*, 2007a; Subiza *et al.*, 2007b]. No obstante, en días puntuales y en zonas de cultivo intensivo, se pueden alcanzar picos de 10.000-14.000 granos/m³ (fuente: SEAIC, <http://www.seaic.org/>).

LA ALERGIA AL POLEN DE OLIVO

La alergia al polen (también denominada polinosis) de olivo presenta una alta incidencia en el área mediterránea [Wheeler, 1992], así como en América del Norte [Vinay & Lewis, 1986], Japón [Miyahara, 1995] o Australia [Baldo *et al.*, 1992]. En España, la polinosis al olivo es la segunda causa de alergias respiratorias tras la de gramíneas. Sin embargo, en zonas donde existe un cultivo intensivo de este árbol, como Jaén o Córdoba donde hay más de 60 millones de olivos, hasta el 90% de los pacientes polínicos está sensibilizado a este polen [Subiza *et al.*, 2007a; Subiza *et al.*, 2007b].

La polinosis al olivo es una enfermedad compleja que resulta de la interacción de factores ambientales y genéticos [Cárdaba *et al.*, 2002; Cárdaba *et al.*, 2007; Quiralte *et al.*, 2007]. Se ha descrito la asociación entre los antígenos HLA-DR7 y DQB2, y la respuesta IgE a Ole e 1 [Cárdaba *et al.*, 1993], Ole e 2 [Quiralte *et al.*, 2005] y Ole e 3 [Cárdaba *et al.*, 2000]. La sintomatología clínica asociada con esta enfermedad se caracteriza por la aparición de conjuntivitis, rinitis, asma y/o malestar general, lo que repercute directamente en la calidad de vida de los pacientes afectados [Liccardi *et al.*, 1996; Quiralte *et al.*, 2005]. Los síntomas se manifiestan una vez que la concentración de polen en la atmósfera traspasa el “umbral de reactivación”. Éste depende de la zona geográfica en la que reside el paciente, por ejemplo, en Jaén el umbral de reactivación se encuentra alrededor de los 400 granos/m³, mientras que en Ciudad Real está en 153 granos/m³ [Florido *et al.*, 1999]. Además, existe también una variación dependiente del paciente, llamada efecto *priming*, en el que la propia respuesta inflamatoria preestablecida disminuye la cantidad de alérgeno necesaria para producir los síntomas en exposiciones posteriores [Connell, 1968].

El grano de polen por su tamaño aerodinámico (15-60 µm) no puede acceder a las vías respiratorias inferiores. Así, la liberación de los alérgenos del grano es un requisito para estar biodisponibles y causar la sensibilización y el desarrollo de los síntomas alérgicos en humanos [Grote *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2004]. Distintos grupos de investigadores han encontrado que la mayor actividad alérgica se localiza en muestras del aerosol atmosférico de tamaño inferior a 10 µm: las partículas submicrónicas (<10 µm de diámetro) y paucimicrónicas (<1 µm de diámetro) [Spieksma *et al.*, 1990; Schäppi *et al.*, 1997; Schäppi *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2004; De Linares *et al.*, 2007]. En el estudio realizado por De Linares *et al.* [2007] demostraron que la actividad alérgica de Ole e 1, alérgeno

principal del olivo, en la atmósfera está asociada a las partículas paucimicrónicas. Las partículas aerotransportadas respirables derivadas del grano de polen comprenden gránulos de almidón y partículas de polisacáridos (partículas-P) [Emberlin, 1995; Spieksma *et al.*, 1995; Schäppi *et al.*, 1997; Monn & Koren, 1999; Schäppi *et al.*, 1999; Behrendt & Becker, 2001]. Aunque en el polen de olivo este tipo de estructuras son escasas o están ausentes.

ALÉRGENOS DEL POLEN DE OLIVO

El alergograma o perfil alergénico del extracto del polen de olivo es heterogéneo y muy complejo [Rodríguez *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002; Batanero *et al.*, 2010]. Hasta la fecha se han identificado, purificado y caracterizado 12 alérgenos del polen de olivo (**Tabla 9**), los cuales han sido denominados desde Ole e 1 hasta Ole e 12, siguiendo la nomenclatura de la IUIS (*International Union of Immunological Societies*) [King *et al.*, 1994].

Tabla 9. Alérgenos del polen de olivo descritos.

Alérgeno	MM (kDa) ¹	pI ²	Prevalencia (%) ³	Familia	Referencia
Ole e 1	16.3/18.5*	4.8-8.0*	55-90*	Ole e 1-like	Villalba <i>et al.</i> , 1993
Ole e 2	14-16**	5.1**	24	Profilina	Ledesma <i>et al.</i> , 1998a
Ole e 3	9.2*	4.3*	20-30	Polcalcina	Batanero <i>et al.</i> , 1996b
Ole e 4	32**	4.6-5.1*	80	Desconocida	Boluda <i>et al.</i> , 1998
Ole e 5	16**	5.1-6.5*	35	Superóxido dismutasa	Boluda <i>et al.</i> , 1998
Ole e 6	5.8*	4.2*	10-55*	Desconocida	Batanero <i>et al.</i> , 1997
Ole e 7	9.9-10.3*	≥9*	<10-47*	nsLTP	Tejera <i>et al.</i> , 1999
Ole e 8	18.8*	4.5**	<5	Proteína ligante de Ca ⁺²	Ledesma <i>et al.</i> , 2000
Ole e 9	46.4*	4.8-5.4*	<10-65*	1,3-β-glucanasa	Huecas <i>et al.</i> , 2001
Ole e 10	10.8*	5.8*	<10-69*	CBM43	Barral <i>et al.</i> , 2005
Ole e 11	39.4**	6.3-9.3*	56-77*	Pectin metilesterasa	Salamanca <i>et al.</i> , 2010
Ole e 12	36**	4.9-5.6*	8-33*	PCBER	Castro <i>et al.</i> [2006]

¹MM, masa molecular determinada mediante espectrometría de masas (*) o PAGE-SDS (**). Para Ole e 1 se muestran las masas moleculares de las formas no glicosilada y glicosilada, respectivamente.

²pI, punto isoeléctrico determinado experimentalmente (*) o deducido de la secuencia de aminoácidos (**).

³Prevalencia: (*) dependiente de la población.

CBM, módulo de unión de carbohidratos; nsLTP, proteína transferidora de lípidos no específica; PCBER, *phenylcoumaran benzylic ether reductase*.

Los alérgenos del polen de olivo se clasifican en alérgenos principales o secundarios, según su prevalencia sea mayor o menor del 50%, respectivamente, entre los pacientes alérgicos al polen de olivo [Rodríguez *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2007]. Sin embargo, la prevalencia de estos alérgenos parece ser dependiente de los niveles atmosféricos de polen y, por tanto, del área geográfica en la que vive la población sensibilizada [Rodríguez *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2001; Barber *et al.*, 2007; Quiralte *et al.*, 2007]. En este sentido, se ha sugerido que los pacientes alérgicos de áreas con niveles de exposición extremadamente altos exhiben alergogramas más complejos en comparación con los pacientes que viven en zonas con bajos niveles de polen en la atmósfera [Rodríguez *et al.*, 1998; Barber *et al.*, 2007;

Quiralte *et al.*, 2007]. A este respecto, se han descrito 45 alergogramas diferentes en el reconocimiento de 8 alérgenos del polen de olivo por 156 sueros de pacientes alérgicos de Jaén [Quiralte *et al.*, 2007].

Dentro del extracto proteico del polen de olivo, Ole e 1 es el alérgeno más relevante y el agente de sensibilización más frecuente, mientras que otros alérgenos como Ole e 6, Ole e 7, Ole e 9 y Ole e 10, pueden ser alérgenos principales o secundarios dependiendo del área geográfica estudiada [Rodríguez *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2007].

Ole e 1, ALÉRGENO PRINCIPAL DEL POLEN DE OLIVO

Ole e 1 es el alérgeno principal del polen de olivo y también la proteína más abundante en el extracto, donde representa hasta el 20% del contenido proteico total [Rodríguez *et al.*, 2002]. El alérgeno muestra una prevalencia entre el 55% y el 90%, dependiendo del área geográfica estudiada [Lauzurica *et al.*, 1988; Wheeler *et al.*, 1990; Rodríguez *et al.*, 1998]. Ole e 1 ha sido identificado como marcador de sensibilización para la familia *Oleaceae* [Palomares *et al.*, 2006]. Aunque, se ha descrito que la eliminación de esta proteína del extracto supone la pérdida de casi toda la alergenicidad del mismo [Lombardero *et al.*, 1992].

Ole e 1 es una glicoproteína de 145 residuos de aminoácidos, que exhibe un alto grado de polimorfismo [Villalba *et al.*, 1993; Villalba *et al.*, 1994; Lombardero *et al.*, 1994; Hamman-Khalifa *et al.*, 2008]. Las diferencias cuantitativas y cualitativas en Ole e 1 son las principales responsables de la distinta actividad alérgica del polen observada entre cultivares [Barber *et al.*, 1990; Geller-Bernstein *et al.*, 1996; Waisel & Geller-Bernstein, 1996; Boluda *et al.*, 1999]. Esta proteína presenta un patrón complejo en PAGE-SDS, compuesto por dos bandas mayoritarias: la forma glicosilada, con una masa molecular aparente de 20 kDa, y la forma no glicosilada, de 18.5 kDa [Villalba *et al.*, 1993; Batanero *et al.*, 1994b]. Además, en las preparaciones de Ole e 1 se pueden observar otras dos formas minoritarias de 22 kDa y de 40 kDa, correspondientes a la forma hiperglicosilada y al dímero de la forma glicosilada, respectivamente. Ole e 1 presenta 6 residuos de cisteína, los cuales se encuentran implicados en la formación de 3 puentes disulfuro [González *et al.*, 2000]. Las posiciones de las 6 cisteínas se encuentran conservadas en los miembros de la familia de proteínas homólogas a Ole e 1 (Ole e 1-like) [González *et al.*, 2002]. Ole e 1 presenta un único sitio de N-glicosilación localizado en la Asn111 [Villalba *et al.*, 1993; Batanero *et al.*, 1994b; Villalba *et al.*, 1994]. El componente N-glicosídico de Ole e 1 es heterogéneo y presenta dos glicoformas mayoritarias: una de tipo “complejo” (GlucNAcMan₃XylGlcNAc₂) con un residuo de β (1,2)xilosa y otra de tipo “rica en manosas” (Man₇GlcNAc₂) [van Ree *et al.*, 2000]. Además, presenta una glicoforma minoritaria (5%) de tipo “complejo” que contiene un residuo de α (1,3)fucosa unido a la N-acetilglucosamina proximal [Batanero *et al.*, 1999; van Ree *et al.*, 2000]. Los residuos de β (1,2)xilosa y los de α (1,3)fucosa están implicados en la unión a IgE e IgG, pero no el componente “rico en manosas” [Batanero *et al.*, 1996c; Batanero *et al.*, 1999; van Ree *et al.*, 2000]. De esta forma, el N-oligosacárido de Ole e 1 presenta actividad alérgica y antigénica, siendo responsable de la reactividad cruzada entre Ole e 1 y glicoproteínas no relacionadas filogenéticamente [Batanero *et al.*, 1994b; Batanero *et al.*, 1996c; Batanero *et al.*, 1999; van Ree *et al.*, 2000]. Además, el componente N-glicosídico *per se* es capaz de inducir la liberación de histamina de basófilos de pacientes alérgicos al polen de olivo [Batanero *et al.*, 1999]. Los miembros de la familia Ole e 1-like presentan un sitio potencial de N-glicosilación, el cual parece conservarse entre los miembros de la misma familia taxonómica, a

excepción de BB18. Este hecho podría estar relacionado con su potencial papel en la modulación de la función biológica y la discriminación entre especies.

Ole e 1 se ha producido como proteína de fusión con la glutatión S-transferasa (GST) en la bacteria *Escherichia coli*, rindiendo un producto de poca calidad y con tendencia a agregar, formando cuerpos de inclusión [Villalba *et al.*, 1994]. El alérgeno se ha producido también como proteína recombinante soluble en la levadura *Pichia pastoris*, con un elevado rendimiento, demostrándose su equivalencia estructural e inmunológica con el alérgeno natural [Huecas *et al.*, 1999; González *et al.*, 2002]. Hasta la fecha, Ole e 1 recombinante ha sido el único alérgeno de olivo usado en pruebas cutáneas con pacientes [Quiralte *et al.*, 2000], dado que los cambios efectuados en la actual legislación española no permite el uso de estas moléculas en humanos.

Ole e 1 es el alérgeno más importante de la familia de proteínas Ole e 1-like [Mothes *et al.*, 2004]. Los miembros de esta familia se expresan específicamente en el polen [Hanson *et al.*, 1989; Twell *et al.*, 1989; Villalba *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 1994] y están implicados en el proceso de fertilización: hidratación del polen y/o la germinación [Muschetti *et al.*, 1994; Alché *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002; Johnson & Preuss, 2003; Alché *et al.*, 2004]. Dicha función concordaría con la localización de Ole e 1 en el retículo endoplasmático rugoso, la pared celular y el tapetum, la cara exterior de la exina, el tubo polínico y en el medio de germinación *in vitro* [Martín-Orozco *et al.*, 1994; Alché *et al.*, 1999; Alché *et al.*, 2002; Alché *et al.*, 2004].

Otros miembros alergénicos de esta familia proteica son: Fra e 1 (fresno, *Fraxinus excelsior*) [Barderas *et al.*, 2005; Barderas *et al.*, 2006], Syr v 1 (lila, *Syringa vulgaris*) [Batanero *et al.*, 1994a; González *et al.*, 2001] y Lig v 1 (aligustre, *Ligustrum vulgare*) [Batanero *et al.*, 1996a; González *et al.*, 2001], miembros de la familia *Oleaceae*. Fra e 1 es un alérgeno importante en Europa central, mientras que Lig v 1 y Syr v 1 sólo son alérgenos importantes en exposición local [Liccardi *et al.*, 1996; D'Amato *et al.*, 1998]. Estos alérgenos muestran una identidad de secuencia con Ole e 1 mayor del 85% y son responsables, en gran medida, de la reactividad cruzada entre los pólenes de la familia *Oleaceae* [Batanero *et al.*, 1994a; Batanero *et al.*, 1996a; Martín-Orozco *et al.*, 1994; Lombardero *et al.*, 2002; Barderas *et al.*, 2005]. Otros alérgenos del polen de olivo implicados en los procesos de reactividad cruzada incluyen: Ole e 2 (profilina) [Ledesma *et al.*, 1998b], Ole e 3 (polcalcina) [Batanero *et al.*, 1996b], Ole e 9 [Palomares *et al.*, 2005] y Ole e 10 [Barral *et al.*, 2004]. La reactividad cruzada es un proceso en el que las IgE específicas generadas frente a un determinado alérgeno pueden reconocer a otro diferente. La similitud estructural entre dos alérgenos es un factor crucial a la hora de mostrar reactividad cruzada, de forma que las proteínas homólogas son posibles candidatas para presentar este tipo de fenómenos. Además, la proximidad filogenética entre las fuentes biológicas de alérgenos aumenta la posibilidad de reactividad cruzada [Baugh *et al.*, 1965; Layton *et al.*, 1970; Leiferman & Gleich, 1976].

Otros miembros alergénicos de la familia Ole e 1-like son: Pla I 1 de *Plantago lanceolata* [Calabozo *et al.*, 2001], Che a 1 de *Chenopodium álbum* [Barderas *et al.*, 2002; Barderas *et al.*, 2004], Lol p 11 de *Lolium perenne* [van Ree *et al.*, 1995] y Phl p 11 de *Phleum pratense* [Marknell DeWitt *et al.*, 2002]. Estas proteínas presentan escasa reactividad cruzada con Ole e 1, debido a la baja identidad de secuencia (27-33%) [van Ree *et al.*, 1995; Calabozo *et al.*, 2001; Barderas *et al.*, 2002; Marknell DeWitt *et al.*, 2002; Barderas *et al.*, 2004]. Recientemente se ha descrito la proteína BB18 de abedul (*Betula verrucosa*) como un miembro no alergénico de la familia Ole e 1-like [Marazuela *et al.*, 2012]. Además se

ha encontrado un cierto grado de identidad a través de la secuencia de aminoácidos deducida de los genes *LAT52* de tomate (*Solanum lycopersicum*) [Twell *et al.*, 1989], *OSPG* de arroz (*Oryza sativa*) [Zou *et al.*, 1994] y *Zmc13* de maíz (*Zea mays*) [Hanson *et al.*, 1989]. Por último, proteínas con identidades de secuencia con Ole e 1 del 24% al 26% se han identificado en el polen de *Phalaris coerulescens* (GeneBank, número de acceso CAA74365) y *Arabidopsis thaliana* (AJ133639), y en la hoja de *Sambucus nigra* (AAF16869).

Los estudios realizados por Cárdbaba *et al.* [1998] permitieron la identificación de dos epítomos T inmunodominantes en la molécula de Ole e 1. Éstos se encuentran localizados en las posiciones 91-102 y 109-130 de la secuencia de aminoácidos. Los primeros estudios para la identificación de los epítomos B de Ole e 1 se llevaron a cabo con anticuerpos monoclonales [Martín-Orozco *et al.*, 1994]. Posteriormente, los estudios de González *et al.* [2002] empleando isoformas recombinantes de Ole e 1, anticuerpos monoclonales y sueros de pacientes pusieron de manifiesto el carácter conformacional de los epítomos B de Ole e 1. Finalmente, el uso de péptidos sintéticos solapantes sobre soportes sólidos y fragmentos recombinantes ha permitido localizar las regiones de unión a IgG e IgE [González *et al.*, 2006]. Se han identificado 7 epítomos IgG, empleando un suero policlonal específico de Ole e 1, en las posiciones: 7-12, 29-34, 55-60, 65-70, 107-112, 119-124 y 134-142. Además, el análisis de los epítomos IgE, empleando sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo, permitió identificar 5 regiones localizadas en las posiciones 1-18, 23-40, 43-76, 101-123 y 131-145 de la secuencia de aminoácidos [González *et al.*, 2006]. Los datos obtenidos señalaron al extremo C-terminal, que abarca la secuencia comprendida entre los residuos 131 y 145, como un epítomo inmunodominante, siendo la Tyr141 crítica para la unión a IgG e IgE.

La identificación de los epítomos T y B ha permitido el diseño de derivados hipoalérgicos de Ole e 1 mediante 3 estrategias: producción de mutantes, alterando o eliminando las zonas de unión a IgE (un mutante puntual -Y141A- y dos de delección -135Δ10 y 140Δ5-) [Marazuela *et al.*, 2007; Marazuela *et al.*, 2008b]; producción de un híbrido entre Ole e 1 y su homólogo no alérgico BB18, OB₅₅₋₅₈, [Marazuela *et al.*, 2012]; y la síntesis de un péptido T, OE₁₀₉₋₁₃₀, [Marazuela *et al.*, 2008b]. Los estudios *in vitro* e *in vivo* han permitido proponer a los hipoalérgenos 135Δ10 y OE₁₀₉₋₁₃₀ como los candidatos idóneos para ser utilizados como vacunas nasales para la alergia [Marazuela *et al.*, 2007; Marazuela *et al.*, 2008b; Marazuela *et al.*, 2012]. Además, el establecimiento de un modelo de ratón alérgico a Ole e 1 [Marazuela *et al.*, 2008b] que refleja las características típicas de los pacientes alérgicos ha permitido ensayar 2 protocolos profilácticos basados en la inducción de tolerancia con vacunas nasales de hipoalérgenos libres o encapsulados [Marazuela *et al.*, 2008a; Marazuela *et al.*, 2008b]. Estos estudios apoyarían el uso de vacunas nasales como alternativa a la SIT convencional para el tratamiento de la alergia.

OBJETIVOS

BLOQUE I. EXOSOMAS TOLEROGÉNICOS DERIVADOS DEL BALF COMO POSIBLE VACUNA NASAL PARA LA ALERGIA

En los últimos años se ha generado un gran interés en el diseño de nuevas formas de inmunoterapia para las alergias respiratorias que resulten más eficaces, seguras y cómodas que las actuales. Una estrategia prometedora es la inducción de tolerancia con vacunas nasales, cuya administración no requiere inyecciones ni personal cualificado. Otra alternativa son las vacunas basadas en exosomas que brindan la posibilidad de modular la respuesta inmune. Partiendo del concepto de exosomas tolerogénicos, tales vehículos podrían constituir la base para el diseño de una vacuna nasal para la alergia, tanto con fines profilácticos como terapéuticos. El objetivo general del primer bloque de esta tesis se puede resumir en el siguiente punto:

Estudiar el potencial uso de exosomas tolerogénicos derivados del BALF como vacuna nasal para la alergia.

De forma desglosada, los objetivos específicos se describen a continuación:

- I. Establecer un modelo de ratón tolerante a Ole e 1. Este modelo se utilizará para aislar los exosomas tolerogénicos del BALF.
- II. Aislar y caracterizar físico-químicamente los exosomas derivados del BALF.
- III. Evaluar un protocolo profiláctico basado en la administración intranasal de exosomas tolerogénicos en un modelo de ratón alérgico. Para los estudios preclínicos se utilizaron dos modelos experimentales: un modelo de ratón sensibilizado a Ole e 1 y otro a Bet v 1.
- IV. Estudiar comparativamente los exosomas derivados del BALF mediante dos tecnologías ómicas: proteómica (espectrometría de masas) y transcriptómica (*microarrays* de DNA). Aplicación a la búsqueda de “marcadores” asociados con la protección inducida por estas nanovesículas.

BLOQUE II. NANOVESÍCULAS DE SECRECIÓN DERIVADAS DEL POLEN COMO VEHÍCULOS DE ALÉRGENOS

La liberación de los alérgenos del grano del polen como partículas aerotransportadas respirables es un requisito para la sensibilización y el desarrollo de los síntomas alérgicos en humanos. Diversos estudios han demostrado que los alérgenos se pueden encontrar en la atmósfera asociados a partículas submicrónicas o paucimicrónicas derivadas del grano de polen, tales como gránulos de almidón o partículas-P. Sin embargo, dichas estructuras facilitarían su penetración en las vías respiratorias induciendo los procesos alérgicos, no se han encontrado o son escasas en el grano de polen de olivo. Hasta la fecha no se ha documentado el mecanismo de liberación de los alérgenos como partículas aerotransportadas respirables por el polen de olivo. Durante las últimas décadas se ha descrito un nuevo mecanismo de secreción basado en exosomas. En la actualidad sólo un estudio ha demostrado la existencia de exosomas en plantas, aunque hay evidencias de que dichas nanovesículas podrían estar implicadas en la respuesta de defensa frente a patógenos. Partiendo de estas premisas, hemos sugerido que los exosomas podrían estar implicados en otros procesos biológicos de la planta, como la germinación del polen. De ser así, los exosomas derivados del polen podrían constituir un mecanismo para la liberación de los alérgenos como partículas aerotransportadas respirables. Así, el objetivo general del segundo bloque de esta tesis ha sido:

Estudiar las nanovesículas de secreción (NVS) derivadas del polen de olivo durante el proceso de germinación, como vehículo de alérgenos.

De forma desglosada, los objetivos específicos se describen a continuación:

- I. Aislar y caracterizar las NVS derivadas del polen de olivo.
- II. Determinar la cinética de liberación de las NVS durante el proceso de germinación *in vitro*.
- III. Determinar si las NVS son vehículos para los alérgenos del polen.
- IV. Evaluar mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, las propiedades inmunológicas de las NVS en pacientes alérgicos al polen de olivo.
- V. Determinar si las NVS constituyen un mecanismo de secreción para pólenes de otras especies de relevancia clínica.
- VI. Detectar la presencia de las NVS en el aerosol atmosférico.

MATERIALES Y MÉTODOS

BLOQUE I. EXOSOMAS TOLEROGÉNICOS DERIVADOS DEL BALF COMO POSIBLE VACUNA NASAL PARA LA ALERGIA

MATERIALES

Animales

Los ratones BALB/c, hembras de seis a ocho semanas de edad, fueron suministrados por Harlan Interfauna Ibérica SA (Barcelona). Los animales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid y se manejaron según la normativa vigente estipulada para la manipulación y cuidado de animales de experimentación.

Fármacos para anestesia y eutanasia

Anestésico: Mezcla de ketamina (9.2 mg/ml; Imagéne 1000) y xilacina (1.2 mg/ml; Xilagesic al 2% (v/v), Laboratorios Calier). Se administraron 140 µl/ratón en tampón fosfato salino (PBS).

Eutanásico: Pentobarbital sódico al 20% (v/v) (Dolethal). Se administraron 100 µl/ratón.

Proteínas

Bet v 1: Alérgeno principal del polen de abedul, fue amablemente cedido por el Dr. Rafael I. Monsalve (ALK-Abelló, Madrid).

Ole e 1: Alérgeno principal del polen de olivo, fue purificado a partir del polen según el protocolo descrito por Villalba *et al.* [1993].

Soluciones de uso general

PBS: NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, pH 7.2-7.4.

TBS: Tris-base 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.6.

Tampón de aplicación de proteínas para electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (PAGE-SDS): Tris-base-HCl 50 mM, pH 6.8, SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v) y azul de Bromofenol al 0.01% (p/v).

Tampón de citometría de flujo para la caracterización de los exosomas (PBS-BSA): PBS con albúmina de suero bovino (BSA) al 0.5% (p/v).

Tampón de lavado para los ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA): Tween 20 al 0.5% (v/v) en PBS.

Tampón de saturación para ELISA: Tween 20 al 0.1% (v/v) y leche en polvo al 3% (p/v) en PBS.

Tampón RIPA: Tris-base 10 mM, Triton X-100 al 1% (v/v), SDS al 0.1% (p/v), deoxicolato sódico al 0.1% (p/v), pH 7.35. A este tampón, empleado para la lisis celular y solubilización de proteínas, se le añade una mezcla de inhibidores de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail* 10X, Sigma-Aldrich) justo antes de su uso.

Tampones de lavado para las inmunodetecciones: PBS-T, PBS con Tween 20 al 0.1% (v/v), utilizado para el lavado de las membranas de nitrocelulosa. En el caso de las inmunodetecciones en membranas de immobilon-nylon (Millipore) se usó el tampón **TBS-T**, TBS con Tween 20 al 0.05% (v/v).

Tampones de saturación para las inmunodetecciones: PBS-T-leche, PBS con Tween 20 al 0.1% (v/v) y leche en polvo al 3% (p/v), utilizado para la saturación de las membranas de nitrocelulosa. **TBS-blocking solution**, TBS con *blocking solution* (Invitrogen) al 1% (v/v), empleado para la saturación de las membranas de immobilon-nylon.

Soluciones empleadas para los ensayos con esplenocitos

GKN completo: Na_2HPO_4 25 mM, NaH_2PO_4 5.5 mM, KCl 5.5 mM y NaCl 137 mM, pH 7.2-7.4. A este medio, utilizado en las diferentes etapas del aislamiento de las células esplénicas, se le añade D-glucosa 11 mM y BSA al 0.2% (p/v) justo antes de su uso.

RPMI completo: RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM y penicilina/estreptomicina 50 U/ml. Todos los reactivos fueron suministrados por Lonza.

Tampón ACK: NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 10 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.1 M, pH 7.2-7.4. Medio de lisis de eritrocitos.

I.I AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DEL BALF

MÉTODOS

En el estudio se utilizaron 3 tipos de exosomas procedentes de animales sometidos a 3 condiciones fisiológicas diferentes: (I) **exosomas control (Exo_{Con})**, vesículas aisladas del BALF de ratones *naïve*, no tratados; (II) **exosomas tolerogénicos (Exo_{Tol})**, vesículas aisladas del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1; y (III) **exosomas alérgicos (Exo_{Ale})**, aislados del BALF de ratones sensibilizados a Ole e 1, según el protocolo descrito por Marazuela *et al.* [2008b].

Inducción de tolerancia

Los ratones ($n=20/\text{grupo}$) fueron tratados vía intranasal (i.n.) con 100 μg de Ole e 1 en 20 μl de PBS, durante 3 días consecutivos, bajo anestesia y en posición supina (**Figura 8**). Transcurridas 24 h desde la última administración i.n., los animales fueron sacrificados con una dosis letal de eutanásico, con el fin de obtener el BALF como fuente de Exo_{Tol} .

El estado de tolerancia se analizó mediante el análisis de los niveles de anticuerpos específicos en suero (IgE, IgG1 e IgG2a), respuesta de las células T e histopatología de los pulmones.

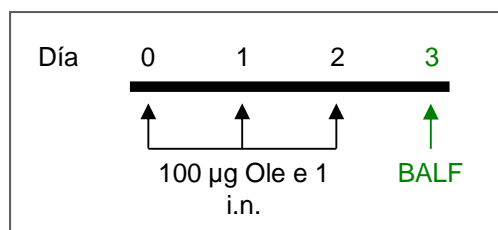


Figura 8. Diseño del protocolo experimental de inducción de tolerancia para el aislamiento de ExoTol. Las flechas negras indican los días de administración i.n. de Ole e 1 y la verde el día del aislamiento del BALF.

Sensibilización alérgica

Los ratones ($n=20/\text{grupo}$) fueron sensibilizados a Ole e 1 según el protocolo descrito por Marazuela *et al.* [2008b] (**Figura 9**). Para ello, los animales fueron sensibilizados vía intraperitoneal (i.p.) con 1 µg de Ole e 1 en presencia del adyuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ o alum (2 mg, Sigma-Aldrich), en 150 µl de PBS. El tratamiento se repitió dos veces (días 0 y 7). La provocación de la respuesta inflamatoria en las vías aéreas se realizó mediante la administración i.n. de 10 µg de Ole e 1 en PBS (20 µl) los días 14, 15 y 16. En algunos experimentos, el BALF se recolectó 24 h después de la última administración i.n. del alérgeno, como fuente de ExoAle, tras sacrificar los animales con una dosis letal de eutanásico. El estado alérgico se confirmó mediante el análisis de los parámetros inmunológicos indicados anteriormente.

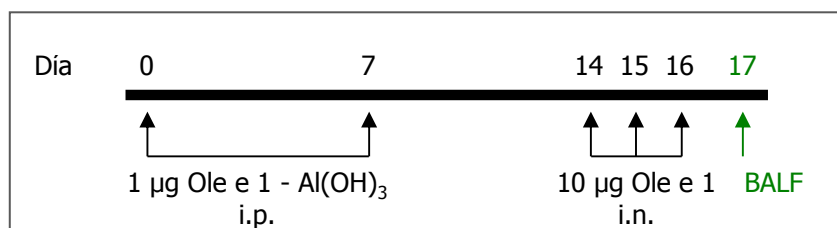


Figura 9. Diseño del protocolo experimental de sensibilización alérgica para el aislamiento de ExoAle. Las flechas negras indican los días de administración del alérgeno (Ole e 1) y la verde el día de la obtención del BALF.

Obtención del BALF

El BALF de los ratones se recolectó, tras canular manualmente la tráquea, mediante la instilación de 1 ml de PBS frío en los pulmones. El proceso se repitió un total de tres veces y los lavados de los 20 ratones se juntaron e, inmediatamente, se utilizaron para aislar los exosomas.

Aislamiento de los exosomas a partir del BALF

Los exosomas se aislaron a partir del BALF de los ratones *naïve* y tratados, según el protocolo estándar de filtración/ultracentrifugación descrito por Théry *et al.* [2006], con pequeñas modificaciones.

La mezcla de los distintos BALF se centrifugó a 300 *g*, durante 10 min a 4°C, con el fin de separar las células presentes en el lavado. El sedimento celular se guardó a -20°C hasta su uso y el sobrenadante se utilizó para el aislamiento de los exosomas. Éste se filtró por 0.22 µm (Renner GmbH) para descartar los posibles restos celulares y otros contaminantes presentes en la muestra. El filtrado se centrifugó a 100.000 *g*, durante 75 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó en un gran volumen de PBS con el fin de solubilizar las posibles proteínas contaminantes. Esta última etapa se

repitió una vez más y el sedimento final se resuspendió en PBS (50 µl/ratón). La cantidad de exosomas aislados se estimó determinando la concentración de proteína total mediante el *kit Micro BCA Protein Assay* (Thermo Scientific).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los exosomas (2 µg) se fijaron en PBS-formaldehído al 2% (v/v) durante 16 h a 4°C y en agitación. Tras dos lavados en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, mediante ultracentrifugación, los exosomas se resuspendieron en 50 µl del mismo tampón. Los exosomas se adsorbieron en rejillas de cobre-carbono (*copper-formwar/carbon-coated grids 200 mesh*, Fedelco) durante 3 min, a temperatura ambiente, y se contrastaron con acetato de uranilo al 1% (v/v) durante 30 s. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión *JEOL 1010* (JEOL), empleando un voltaje de trabajo de 80 kV. El análisis de las muestras se llevó a cabo en el centro de Microscopía Electrónica (UCM, Madrid), utilizando el programa *Soft Imaging Viewer* para la visualización y procesamiento de las imágenes.

PAGE-SDS

PAGE-SDS en gradiente

Las electroforesis se llevaron a cabo en geles preformados del 4 al 12% (p/v) de poliacrilamida (*NuPAGE Novex Bis-Tris Mini Gels*, 8 cm x 8 cm x 1 mm, Invitrogen) de 10 pocillos. El desarrollo de las mismas se realizó en un sistema de electroforesis *Novex NuPAGE Bis-Tris* (Invitrogen), utilizando una intensidad de corriente constante de 130 mA/gel.

Las muestras de exosomas (10 ó 30 µg de proteína total) se resuspendieron en tampón de aplicación (*Loading Buffer*, Invitrogen) añadiéndose, en algunos casos, 2-mercaptoetanol (2-ME) al 5% (v/v). Las células del BALF se lisaron en tampón RIPA, se cuantificó el contenido proteico total mediante el *kit Micro BCA Protein Assay* y se mezclaron con el tampón de aplicación. En ambos casos las muestras se calentaron a 70°C durante 10 min, antes de su aplicación en el gel.

Las electroforesis se desarrollaron en tampón *NuPAGE MOPS SDS Running Buffer* (Invitrogen) al que se le añadió, antes de su uso, el agente antioxidante *NuPAGE Antioxidant* (Invitrogen) al 0.5% (v/v). La electroforesis se detuvo una vez que el marcador azul de Bromofenol alcanzó el extremo final del gel.

Seguidamente, el gel se tiñó con *Bio-Safe Coomassie Stain* (Bio-Rad), según las instrucciones de la casa comercial, para la visualización directa de las proteínas, o bien, se transfirió a membranas de immobilon-nylon para los ensayos de inmunodetección.

PAGE-SDS discontinua

Las electroforesis se realizaron en un sistema discontinuo, según el procedimiento descrito por Laemmli [1970]. La polimerización de los geles y el desarrollo de la electroforesis se llevaron a cabo en un sistema *Mini-Protean III* de Bio-Rad. Los geles de 0.75 mm de espesor, 7 cm de alto y 9 cm de ancho, se preformaron con peines de 10 ó 15 pocillos, según el ensayo a realizar. En cada pocillo se aplicaron de 6.25 ng a 30 µg de proteína total en un volumen máximo de 15 µl. Se prepararon geles homogéneos al 15% (p/v) de poliacrilamida con un gel concentrante al 4% (p/v).

Las muestras se disolvieron en tampón de aplicación con 2-ME al 5% (v/v), y en el caso de los exosomas, éstos fueron sometidos a dos ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 42°C, para asegurar la liberación del contenido proteico. Posteriormente, las muestras se calentaron a 95°C durante 10 min, y se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min a temperatura ambiente, antes de ser aplicadas en los geles.

La electroforesis se desarrolló en tampón Tris-base 25 mM, glicocola 192 mM y SDS al 0.1% (p/v). La intensidad de corriente aplicada fue de 25 mA/gel, finalizándose la electroforesis cuando el marcador del frente (azul de Bromofenol) alcanzó el extremo final del gel. Seguidamente, el gel se transfirió a membranas de nitrocelulosa para los ensayos de inmunodetección.

Transferencia electroforética a membranas

Membranas de immobilon-nylon

La transferencia electroforética de las proteínas a membranas de immobilon-nylon se llevó a cabo según el protocolo descrito por Théry *et al.* [2006]. La transferencia se realizó en tampón carbonato-bicarbonato sódico 100 mM, pH 9.5, a una intensidad de corriente constante de 1 mA/cm² durante 16 h, en un sistema húmedo. La eficacia de la transferencia a la membrana se comprobó mediante la visualización directa de los patrones de proteínas preteñidas de masa molecular conocida (*Molecular Weight NuPAGE MOPS*, Invitrogen).

Membranas de nitrocelulosa

La transferencia electroforética de las proteínas se llevó a cabo según el protocolo descrito por Towbin *et al.* [1979] y como membrana inmovilizante se utilizó nitrocelulosa (*Hybond ECL 0.45 µm*, Amersham). La transferencia se realizó en tampón Tris-base 48 mM, glicocola 39 mM, SDS al 0.0375% (p/v) y metanol al 20% (v/v), a una intensidad de corriente de 1 mA/cm² durante 1 h. La eficacia de la transferencia se comprobó mediante la visualización directa de los patrones de proteínas preteñidas con azul de Coomassie (*Prestained SDS-PAGE Standards, low range* de Bio-Rad).

Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas

Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de immobilon-nylon

Las inmunodetecciones se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Théry *et al.* [2006]. Después de la transferencia electroforética de las proteínas, la membrana se incubó durante 10 min en TBS-T con el fin de rehidratarla. A continuación, se bloqueó con TBS-*blocking solution* durante 30 min y, seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en el mismo tampón durante 1 h (**Tabla 10**). Tras realizar 3 lavados, de 10 min cada uno con TBS-T, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), durante 45 min (**Tabla 10**). Tras una nueva etapa de lavado, el revelado se llevó a cabo mediante el método del reactivo quimioluminiscente para la detección de la HRP (ECL, Amersham), según las instrucciones de la casa comercial. Finalmente, la emisión de quimioluminiscencia fue analizada en un sistema *ChemiDoc XRS* (Bio-Rad). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente, con agitación.

Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa

Después de la transferencia electroforética de las proteínas, se procedió a su inmunodetección [Batanero *et al.*, 1996b]. Para ello la membrana se hidrató durante 10 min en PBS y se incubó durante 1 h en PBS-T-leche. Seguidamente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-Ole e 1 (ver apartado *Anticuerpos monoclonales y policlonales*, sección *Inmunodetección* de Materiales y Métodos, página 53) o anti-Flotilina durante 1 h (**Tabla 10**). Tras un lavado exhaustivo de la membrana en PBS-T, se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (GAR, 1/3.000, Bio Rad) o de ratón (GAM, 1/2.500, Pierce) ambos conjugados con HRP, respectivamente. Posteriormente, la membrana se lavó en PBS-T y el revelado se llevó a cabo mediante el método del ECL, según las instrucciones del fabricante, en un analizador de quimioluminiscencia *LAS-3000 mini* (Fujifilm). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y en agitación.

Tabla 10. Anticuerpos utilizados para la caracterización de los exosomas del BALF.

Antígeno	Dilución	Especie ¹	Casa comercial
Anticuerpos primarios			
Alix	1/250	Ratón	BD Pharmigen
CD9	1/500	Rata	BD Pharmigen
Clatrina	1/1.000	Ratón	BD Pharmigen
Flotilina	1/250	Ratón	BD Pharmigen
gp96	1/1.000	Rata	StressGen
hsc70	1/300	Conejo	Sigma-Aldrich
ICAM-1	1/300	Ratón	Beckman Coulter
MFGE-8	1/2.000	Conejo	²
MHC-I	1/300	Conejo	²
MHC-II	1/1.000	Conejo	²
SP-B	1/1.000	Conejo	Chemical Int.
Tsg101	1/100	Cabra	Santa Cruz
Anticuerpos secundarios			
Anti-IgG-HRP	1/10.000	Cabra	Pierce
Anti-IgG-HRP	1/20.000	Conejo	Pierce
Anti-IgG-HRP	1/10.000	Rata	Pierce
Anti-IgG-HRP	1/1.000	Ratón	Pierce

¹Se indica la especie huésped.

²Los anticuerpos fueron preparados en el laboratorio de la Dra. Clotilde Théry del Institut Curie (París, Francia).

gp96, glicoproteína 96; HRP, peroxidasa de rábano; hsc70, proteína de choque térmico 8 de 70 kDa; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular 1; MFGE-8, lactaderina; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; SP-B, proteína del surfactante pulmonar B; Tsg101, proteína celular tumoral humana susceptible al gen 101.

Caracterización de los exosomas mediante citometría de flujo

Anclaje de los exosomas a bolas de látex

Los exosomas se incubaron con bolas de látex (*Surfactant-free aldehyde/sulfate latex beads 4 μm* , Invitrogen) a una relación 2:1 (v/v) en PBS durante 15 min, a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió PBS hasta obtener una relación 1:400 (v/v) y se incubaron durante 16 h, con agitación, a 4°C. El bloqueo de los grupos reactivos libres existentes en las bolas de látex se realizó mediante la adición de glicocola 1 M, pH 2.4 (relación 1:10 (v/v)), e incubación durante 30 min, a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 8.000 g, durante 3 min a 4°C, la muestra se lavó dos veces con 1 ml de tampón PBS-BSA. Finalmente, se resuspendió en 250 μl del mismo tampón, utilizándose 10 μl de la suspensión para cada análisis.

Citometría de flujo

Todas las incubaciones se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo redondo (Costar), a 4°C y en oscuridad. Los exosomas, previamente anclados a bolas de látex, se incubaron con 50 μl del anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón PBS-BSA durante 30 min (**Tabla 11**). Tras un lavado con el mismo tampón (50 μl /pocillo), las muestras se resuspendieron en 200 μl del tampón PBS-BSA para su análisis en un citómetro de flujo *FACScalibur* (Beckman). En el caso de los anticuerpos primarios conjugados con biotina se realizó una última incubación con estreptavidina-ficoeritrina (ST-PE, 1/200, BD Pharmigen) durante 15 min. En cada caso se utilizaron los isotipos control de los anticuerpos.

Tabla 11. Anticuerpos utilizados para la caracterización de los exosomas mediante citometría de flujo.

Antígeno	Molécula conjugada	Dilución	Clon	Especie ¹
CD9	Biotina	1/200	KMC8	Ratón
MHC-I	FITC	1/200	SF1-1.1	Ratón
MHC-II	PE	1/200	AMS-32.1	Ratón

¹Se indica la especie huésped.

Todos los anticuerpos fueron suministrados por BD Pharmigen.

FITC, isotiocianato de fluoresceína; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; PE, ficoeritrina.

Centrifugación en gradiente de sacarosa

Los exosomas (50 μg) se resuspendieron en Tris-base 20 mM, pH 7.2 y se aplicaron sobre un gradiente de sacarosa (de 0 a 2 M), según el protocolo descrito por Théry *et al.* [2006]. Las muestras se centrifugaron a 100.000 g durante 20 h a 4°C. Las diferentes fracciones recogidas (750 μl) se lavaron con un gran volumen de PBS a 100.000 g, durante 75 min a 4°C, con el fin de eliminar las trazas de sacarosa presentes en las mismas. Los diferentes sedimentos se analizaron mediante TEM o inmunodetección en membranas de nitrocelulosa.

Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros de infrarrojos mediante transformada de Fourier (FTIR) fueron adquiridos, a temperatura ambiente, en un espectrofotómetro *IFS 66/S FTIR* (Bruker, Ettlingen) en la configuración de

reflexión total atenuada [Alegre-Cebollada *et al.*, 2008]. El aparato, equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado, contiene una placa de germanio como elemento de reflexión interna (ángulo de incidencia de 45° y 5 reflexiones internas). Sobre la placa de germanio se aplicaron 20 µl de una suspensión de exosomas (0.5 µg/ml) en agua, que se secaron bajo un flujo de nitrógeno hasta obtener una fina película. Se utilizó un flujo de aire seco (15 l/min) para purgar el elemento óptico y los compartimentos de la muestra con el fin de minimizar la contribución del vapor de agua en las medidas. El espectro resultante de cada muestra es el promedio de 256 escaneos, con una resolución de 2 cm⁻¹. Todos los espectros obtenidos fueron registrados entre 4.000 y 650 cm⁻¹, y corregidos para la absorción de agua atmosférica según el método descrito por Goormaghtigh *et al.* [1999]. Los espectros fueron suavizados mediante apodización de su transformada de Fourier por una nueva transformada de Fourier de una línea gaussiana de 4 cm⁻¹. Para asegurar la reproducibilidad de las medidas, los espectros se adquirieron por triplicado, llevándose a cabo tres experimentos independientes.

Espectrometría de masas

Las proteínas presentes en los exosomas (10 µg) fueron precipitadas con ácido tricloroacético al 6% (v/v) y 2 µl de una solución saturada de deoxicolato sódico. Posteriormente, el precipitado se lavó dos veces con acetona fría al 80% (v/v) y se secó bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente [Casado-Vela *et al.*, 2006]. Las muestras se disolvieron hasta una concentración de 1 mg/ml en bicarbonato amónico 25 mM, pH 8.0, conteniendo urea 8 M, y al que se le había añadido ditiotretol y iodoacetamida para su reducción y carboximetilación. Las digestiones con tripsina (Promega) o quimotripsina (Princeton Separations) se llevaron a cabo a una relación enzima/sustrato de 1:20 (p/p), durante 10 h a 37°C. Los péptidos resultantes se resuspendieron en ácido fórmico al 0.1% (v/v).

La separación de los péptidos obtenidos se llevó a cabo mediante un sistema de cromatografía de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS, *Ultimate 3000 HPLC*, LC Packings), empleándose una columna *C18 PepMap* de fase reversa (75 µm x 15 cm, LC Packings). Los péptidos se separaron empleando un gradiente lineal de acetonitrilo del 5 al 60% (v/v), con ácido fórmico al 0.5% (v/v), en 120 min. El flujo fue de 300 nl/min. Los péptidos se escanearon y se fragmentaron en un espectrómetro de masas *LTD Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific). Los espectros se adquirieron entre 400-2000 *m/z*, y se contrastaron frente a la base de datos *IPI FASTA version 3.84* de ratón (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPImouse.html>), que contenía 59.995 entradas. La búsqueda en la base de datos de las proteínas en base a su espectro de fragmentación, se llevó a cabo con el *software SEQUEST* (Thermo Fisher Scientific) y se consideraron los siguientes parámetros: (I) tripsina o quimotripsina como enzimas proteolíticas, permitiendo una inespecificidad de reconocimiento de sitio de corte, (II) carboxiamidometil-cisteína como modificación fija y (III) oxidación de las metioninas, como modificación variable. Únicamente se aceptaron los péptidos con una tolerancia en la medida de la masa del precursor de ±5 ppm y ±0.005 Da en los fragmentos. Se estableció un filtro de confianza <5% de falsos positivos.

Los datos obtenidos se incluyeron en la base de datos de acceso público PRIDE (*Proteomics Identification Database*, <http://www.ebi.ac.uk/pride/>) tras su conversión a formato XML empleando el *software PRIDE converter version 2.5.3*. Para la preparación de las muestras, el análisis por espectrometría de masas y el procesamiento de los datos se siguieron las directrices recomendadas por

la normativa *MIAPe* (*Minimum Information About a Proteomics Experiment*) [Taylor *et al.*, 2007a]. Estos estudios fueron realizados por el Dr. Juan Casado-Vela de la Unidad de Oncología del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC, Madrid).

La identificación de proteínas mediante digestión en gel (PAGE-SDS en gradiente) se realizó tras una breve tinción con *Bio-Safe Coomassie Stain*. Para ello se cortaron las bandas en secciones de 1 mm de ancho, las cuales fueron reducidas, alquiladas y digeridas con tripsina según el protocolo descrito por Shevchenko *et al.* [1996]. Los péptidos extraídos se secaron y se solubilizaron en agua/acetonitrilo (relación 95:5 (v/v)). Un tercio de las proteínas digeridas y concentradas se separaron en un sistema de HPLC-MS/MS (*LC-Pakings*, Dionex), el cual estaba acoplado a un sistema de ionización por nanoelectrospray *II QSTAR/Pulsari* (Applied Biosystems). La búsqueda, en base al espectro de fragmentación de las proteínas, se llevó a cabo con el software *MASCOT* (<http://www.matrixscience.com/>) frente a la base de datos del *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov). Los archivos de *MASCOT* obtenidos se exportaron al software *PROMS* y cada uno de los péptidos fue validado manualmente. Estos estudios fueron realizados en el laboratorio de la Dr. Clotilde Théry del Institut Curie (París, Francia).

Microarrays de DNA

El RNA total de los Exo_{Con} y Exo_{Tol} (400 µg) fue aislado empleando el *kit miRNeasy Mini* (Quiagen), según las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de las preparaciones se determinaron mediante un espectrofotómetro *NanoDrop-100* (Thermo Scientific) y la integridad del RNA obtenido se analizó en un *Bioanalyzer 2100B* (Agilent).

El RNA total aislado se empleó para la síntesis de cDNA, el cual sirvió como molde para la síntesis de RNA complementario (cRNA). El cRNA obtenido se biotiniló y se fragmentó (35-200 bases) antes de su hibridación en la plataforma *GeneChip mouse genome 430A 2.0* (Affymetrix), capaz de detectar más de 22.000 transcritos. La hibridación y lavado de los *microarrays* se realizó en un equipo *Hybridization Oven 640* (Affymetrix) y *Fluidics Station 450* (Affymetrix), respectivamente. Para la lectura de los datos de hibridación se empleó el escáner *GeneChip Scanner 3000* (Affymetrix), que incorpora un software específico para la obtención de los datos. Estos ensayos fueron realizados en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (UCM, Madrid).

Para identificar los genes diferencialmente expresados con significancia estadística en las muestras de Exo_{Tol} y Exo_{Con} se utilizó el test de la *t* de Student. Sólo se consideraron como diferencias estadísticas valores de $p < 0.005$.

Red de interacción entre proteínas/genes

El software *STRING version 9.0* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, <http://www.string-db.org/>) se utilizó para analizar las relaciones funcionales en el conjunto de proteínas y genes expresados diferencialmente en los exosomas del BALF, tras la inducción de tolerancia. *STRING* es una base de datos de interacción de proteínas conocidas y predichas, que incluye asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales), y que integra la información sobre vecindad genómica, fusión de genes, co-ocurrencia, co-expresión, experimentos, base de datos y minería de textos [Szklarczyk *et al.*,

2011]. De esta forma, el *software* genera una visualización gráfica a partir de los datos obtenidos en los experimentos de proteómica y transcriptómica, y su agrupamiento en *clusters*. El *score* de confianza aplicado varió entre 0.7 (confianza alta) y 0.9 (máxima confianza). Así, esta configuración permite la obtención de redes de interacción con un alto nivel de confianza. Las anotaciones de los genes y de las proteínas siguen los términos de la ontología génica (GO, *Gene Ontology*). La base de datos GO (<http://www.geneontology.org>) fue diseñada con el fin de estandarizar los procesos biológicos, funciones moleculares y la localización subcelular de los productos de los genes conocidos [Ashburner *et al.*, 2000].

Predicción de mRNAs diana para los microRNAs

La base de datos *miRBase release 18.0* (<http://www.mirbase.org/>) [Kozomara & Griffiths-Jones, 2011] reúne, entre otra información, enlaces directos a *softwares* de búsqueda de dianas de mRNA. Desde *miRBase* se accedió al *software TargetScan version 5.2* (<http://www.targetscan.org/>), desarrollado por Lewis *et al.* [2005], para la predicción de los mRNAs diana. Este *software* se basa en la complementariedad de secuencia de los sitios diana, con énfasis en el emparejamiento perfecto en la región genómica 3'-no codificante (3'-UTR, 3'-*untranslated región*) y sobre la conservación de secuencias entre especies. Asociados a cada resultado, *TargetScan* ofrece una puntuación contextualizada del sitio (TCS, *Total Context Score*) en lo que considera características de vecindad como el contenido en AU de las regiones exploradas y las posiciones de las mismas dentro de la secuencia del mRNA [Grimson *et al.*, 2009]. También genera el valor agregado de P_{CT} , que es un estimador bayesiano de la probabilidad de que dicho sitio esté conservado evolutivamente debido a una presión selectiva [Friedman *et al.*, 2009]. Como las puntuaciones contextuales se calculan en base a información completamente ortogonal al grado de conservación evolutiva del sitio de unión, los valores de TCS y P_{CT} proporcionan información complementaria sobre la calidad de las predicciones realizadas.

Predicción de rutas de KEGG enriquecidas

El *software DIANA miRPath version 2.0*, incluido en el programa *DIANA Lab (DNA Intelligent Analysis)*, (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>) [Papadopoulos *et al.*, 2009], se utilizó para definir las rutas que están enriquecidas en las dianas predichas para los microRNAs diferencialmente expresados en los exosomas del BALF, tras la inducción de tolerancia. Este *software* compila listas de mRNAs diana predichas para los microRNAs y busca el enriquecimiento de las dianas en las rutas metabólicas anotadas en la base de datos *KEGG version 63 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)*, (<http://www.genome.jp/kegg/>) [Kanehisa *et al.*, 2012]. Los resultados del análisis fueron convertidos en un mapa de agrupamiento jerárquico (*heatmap*) usando el $-\ln(p\text{-value})$, donde se representaron los mRNAs diana para cada uno de los microRNAs en función de las rutas *KEGG*. Sólo se consideraron aquellas rutas cuyo $-\ln(p\text{-value})$ de unión era >10 . Después de filtrar las rutas con alta puntuación, se aplicó un segundo criterio en el que se consideraron sólo aquellas rutas con un $-\ln(p\text{-value}) >3$ para, al menos, el 25% de los microRNAs analizados.

Para aumentar el grado de significancia biológica de las rutas enriquecidas se utilizaron los *softwares* de predicción de mRNAs diana: *TargetScan* y *PicTar*, también incluidos en *DIANA Lab*. El

software *PicTar* (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) también tiene en cuenta la complementariedad de secuencia óptima entre la región genómica 3'-UTR del gen diana predicho y el microRNA [Krek *et al.*, 2005].

Las rutas *KEGG* enriquecidas fueron visualizadas con el programa *Tree View* de *MeV* version 4.4.0 (*MultiExperiment Viewer*, <http://www.tm4.org/mev/>) [Saeed *et al.*, 2006], tras realizar un agrupamiento o *clustering* jerárquico con los datos obtenidos para cada microRNA. Para ello se empleó la herramienta *Clustering* incluida en *MeV*, de manera que se utilizó la distancia euclídea para calcular las distancias entre los genes.

KEGG engloba una colección de mapas de rutas generados manualmente, que representan el conocimiento existente sobre interacciones moleculares y redes de interacciones metabólicas, procesado de información genética, procesado de información ambiental, procesos evolutivos y enfermedades humanas. Finalmente, se completó este estudio de enriquecimiento funcional de los genes expresados diferencialmente con búsquedas exhaustivas en la base datos de bibliografía (*PubMed*) y de genes (*Entrez Gene*) del NCBI.

I.II ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DEL BALF

MÉTODOS

Con el fin de analizar las propiedades inmunomoduladoras de los exosomas derivados del BALF se analizaron los niveles de anticuerpos específicos en suero (IgE, IgG1 e IgG2a), respuesta de las células T e histopatología de los pulmones, en todos los experimentos realizados.

Protocolo profiláctico con exosomas

Los ratones ($n=7/\text{grupo}$) fueron tratados vía i.n., bajo anestesia, con 20 μl de una suspensión de Exo_{Tol} (0.083 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en PBS, procedentes de animales tolerantes a Ole e 1, durante 3 días consecutivos antes de la sensibilización al alérgeno (**Figura 10**).

En los experimentos a **corto plazo** los ratones fueron sensibilizados a Ole e 1 una semana después del tratamiento con los exosomas, según el protocolo descrito por Marazuela *et al.* [2008b]. El día 26 se procedió a la extirpación de los pulmones y el día 32 se realizó la toma de muestras de sangre y la extirpación de los bazo.

En los experimentos a **largo plazo**, la sensibilización al alérgeno se realizó 10 semanas después del tratamiento. La extirpación de los pulmones se realizó el día 89 y la toma de muestras de sangre y la extirpación de los bazo el día 95.

En ambos casos, se establecieron 3 grupos de animales: *grupo 1*, ratones sensibilizados a Ole e 1, previamente tratados con Exo_{Tol}; *grupo 2*, animales tratados con Exo_{Con} antes de la sensibilización con el alérgeno (ratones *sham*); y *grupo 3*, animales no tratados (ratones *naïve*). En otros experimentos a **corto plazo**, los animales fueron tratados con Exo_{Ale}, antes de la sensibilización a Ole e 1.

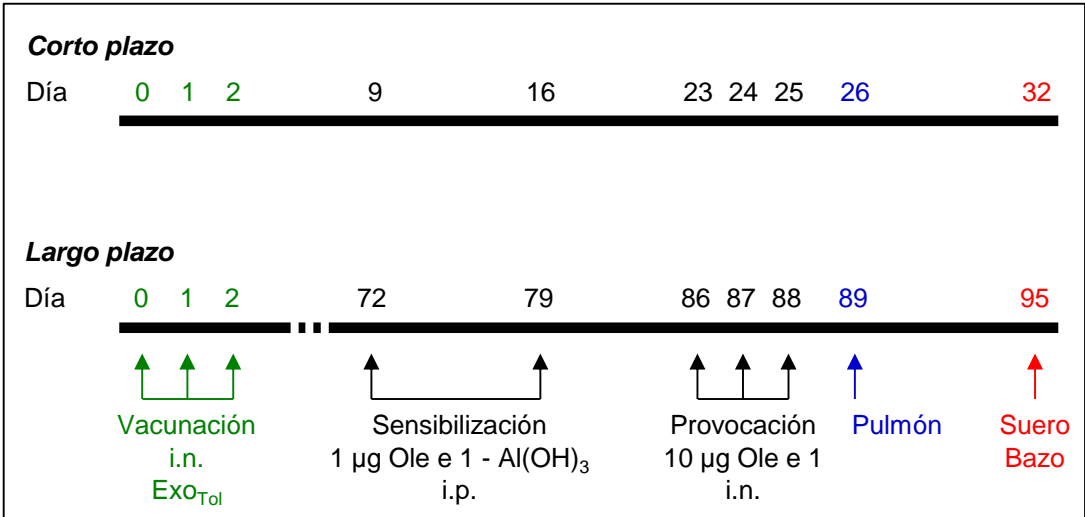


Figura 10. Diseño del protocolo experimental del tratamiento profiláctico, a Corto y Largo plazo basado en la administración i.n. de Exo_{Tol}. Las flechas verdes indican los días de administración i.n. de la vacuna; las negras, los días de la sensibilización frente al alérgeno Ole e 1; la azul, el día de la extirpación de los pulmones; y la roja, el día de la extirpación de los bazo y de la toma de muestras de sangre.

Supresión “bystander”

Los ratones (*n*=5-7/grupo) se trataron vía i.n., bajo anestesia, con 20 µl de una suspensión de Exo_{Tol} (0.083 µg/µl en PBS), aislados de ratones tolerantes a Ole e 1, durante 3 días consecutivos (**Figura 11**). Después de 7 días, los ratones fueron sensibilizados frente a Bet v 1, alérgeno principal del polen de abedul, según el protocolo descrito por Marazuela *et al.* [2008b]. El día 26 se procedió a la extirpación de los pulmones, con el fin de analizar la respuesta inflamatoria local, y el día 32 se procedió a la extirpación de los bazo y a la toma de muestras de sangre. Se establecieron 3 grupos en el estudio: *grupo 1*, ratones pretratados con Exo_{Tol} antes de la sensibilización frente al alérgeno Bet v 1; *grupo 2*, tratados con Exo_{Con} y sensibilizados a Bet v 1 (ratones *sham*); y *grupo 3*, no tratados ni sensibilizados (ratones *naïve*).

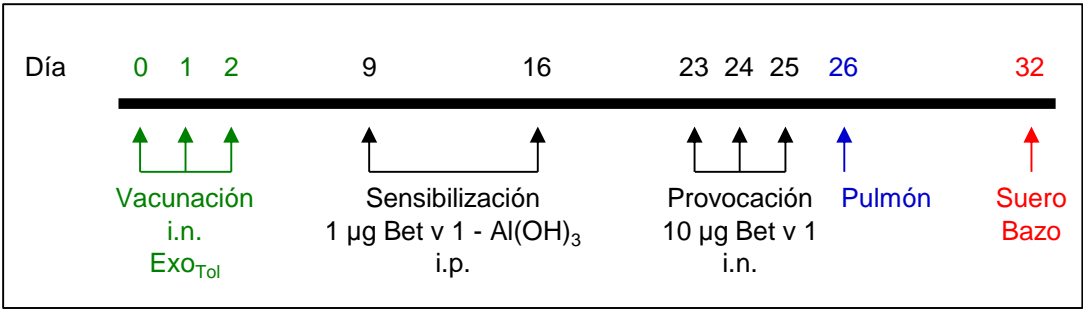


Figura 11. Diseño del protocolo experimental del tratamiento “bystander” basado en la administración i.n. de Exo_{Tol}. Las flechas verdes indican los días de administración i.n. de la vacuna; las negras, los días de la sensibilización con el alérgeno Bet v 1; la azul, el día de la extirpación de los pulmones; y la roja, el día de la extirpación de los bazo y de toma de muestras de sangre.

Sensibilización con Exo_{Ale}

En un estudio preliminar, se ensayaron 2 protocolos de sensibilización de los ratones con Exo_{Ale}.

En el **Protocolo A (Figura 12)**, los animales ($n=5/\text{grupo}$) fueron sensibilizados vía i.n., bajo anestesia, con 2 μg de Exo_{Ale} en 20 μl de PBS, durante 5 días consecutivos (días 0-4). Diez días después, los animales se sometieron a una provocación vía i.n., bajo anestesia, con 10 μg de Ole e 1 en un 20 μl de PBS, durante 3 días consecutivos.

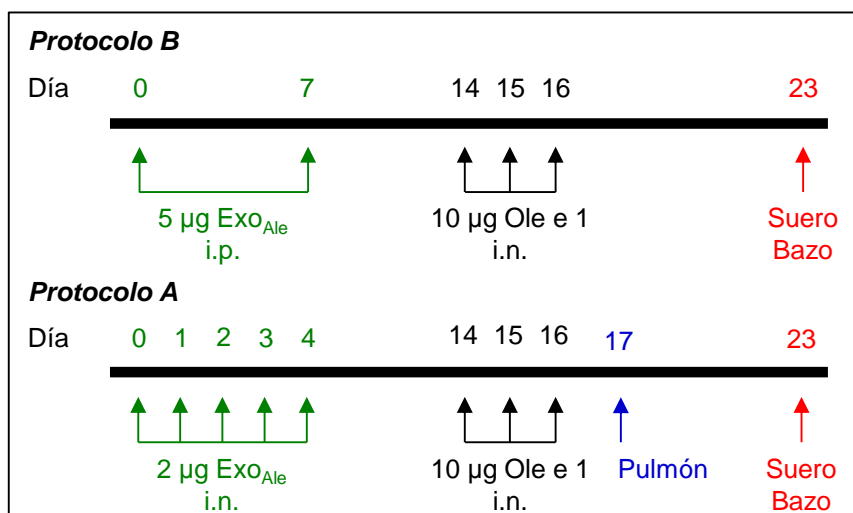


Figura 12. Diseño experimental de los protocolos de sensibilización con Exo_{Ale}. Las flechas verdes indican los días de administración de los exosomas, vía i.p. o vía i.n.; las negras muestran los días de la provocación con el alérgeno Ole e 1; y las rojas, el día de la extirpación de los bazo y la toma de muestras de sangre.

En el **Protocolo B (Figura 12)**, los ratones ($n=5/\text{grupo}$) fueron sensibilizados vía i.p., los días 0 y 7, con 5 μg de Exo_{Ale} en 100 μl de PBS. Una semana después, se llevó a cabo la provocación con el alérgeno en las condiciones anteriormente descritas (**Protocolo A**).

El día 17 se extirparon los pulmones y el 23 se tomaron muestras de sangre y se extirparon los bazo, con el fin de analizar la respuesta alérgica. Se establecieron 4 grupos experimentales: *grupo 1*, ratones sensibilizados con Exo_{Con} y provocados con Ole e 1 (ratones *sham*); *grupo 2*, ratones sensibilizados con Exo_{Ale} y provocados con Ole e 1; *grupo 3*, ratones sensibilizados y provocados con Ole e 1 (ratones alérgicos), según el protocolo descrito por Marazuela *et al.* [2008b]; y *grupo 4*, animales no tratados (ratones *naïve*).

Análisis histopatológico

Los pulmones ($n=2/\text{grupo}$) se extirparon 24 h después de la última administración i.n. del alérgeno, destinándose el lóbulo izquierdo para el análisis histológico. Los órganos se fijaron en una solución de formaldehído al 10% (v/v), antes de su inclusión en parafina. Se cortaron 10 secciones longitudinales de 5 μm a distintas alturas del órgano (comienzo, medio y final) con un microtomo tipo "minot" (Microm). Tras el desparafinado de los cortes, las diferentes secciones de cada una de las piezas

se tiñeron empleando dos técnicas histológicas diferentes: (I) Hematoxilina-eosina (H&E), con la que se tiñen de azul las estructuras de naturaleza basófila como los núcleos y de rosa, más o menos intenso, las estructuras acidófilas como las fibras de colágeno presentes en el citoplasma; y (II) ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS), que tiñe de púrpura todo tipo de carbohidratos como el glucógeno, mucopolisacáridos, glicolípidos, glicoproteínas, etc. Las secciones se observaron en un microscopio óptico (Zeiss modelo Axiophot 2) y se fotografiaron con una cámara digital (*Spot Insight Color*).

La respuesta inflamatoria en los pulmones se evaluó en base a los siguientes criterios histológicos: (I) grado de infiltración celular, (II) tipos de células presentes en el infiltrado, (III) número de eosinófilos, (IV) secreción de moco y formación de tapones intrabronquiales, y (V) morfología de las células epiteliales.

Determinación de los niveles de anticuerpos específicos en suero

Preparación de los sueros de ratón

Las muestras de sangre ($n=5$ /grupo) se tomaron 7 días después de la última administración i.n. del alérgeno. Con el fin de obtener el suero, las muestras se dejaron sedimentar al menos 1 h a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugaron a 16.000 *g* durante 20 min. El sedimento se descartó y los sobrenadantes, correspondientes a los sueros, se conservaron a -20°C hasta su uso.

Determinación de los niveles de IgE total

La determinación de los niveles de anticuerpos IgE total en los sueros de los ratones (dilución 1/80), se llevó a cabo mediante ELISA en sándwich utilizando el *kit Mouse IgE optEIA* de Pharmigen (Becton Dickinson), según las indicaciones de la casa comercial. Los estudios previos llevados a cabo por Batanero *et al.* [2002] demostraron que en este modelo de ratón, los niveles de IgE específica en suero pueden ser estimados midiendo los niveles de IgE total. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, fondo plano y alta capacidad de unión (Costar), realizándose cada determinación por duplicado.

Determinación de los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos

Los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos se determinaron mediante ELISA, según el protocolo descrito por Batanero *et al.* [2002]. Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, fondo plano y alta capacidad de unión, realizándose cada determinación por duplicado.

Brevemente, las placas se tapizaron con el antígeno correspondiente (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en PBS, y se incubaron toda la noche a 4°C . Tras 4 lavados en PBS-T, se bloquearon los sitios de unión inespecífica mediante incubación en tampón de saturación durante 1 h. Transcurrido este tiempo, las placas se incubaron con los sueros de ratón diluidos en tampón de saturación, durante 2 h. Se emplearon diluciones comprendidas entre 1/10.000-1/50.000 y 1/100-1/400 para la determinación de los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos, respectivamente. Tras una nueva etapa de lavado, se procedió a la incubación de las placas con el anticuerpo secundario correspondiente, durante 1 h. Para ello se emplearon anticuerpos de conejo anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón conjugados con HRP, ambos diluidos 1/5.000 (Rockland). Tras una etapa final de lavado, se procedió al revelado de las placas con el cromógeno *o*-fenilendiamina (0.63 mg/ml, Merck) y H_2O_2 al 0.03% (v/v) en citrato sódico 0.1 M, pH 5.0 y metanol al 4%

(v/v) (100 µl/pocillo). La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 3 N (100 µl/pocillo). La densidad óptica (DO) de cada pocillo se midió a 492 nm en un lector de ELISA *Expert 96* (ASYS Hitech).

Estudio de la respuesta de las células T específicas

Cultivo de células esplénicas

Los ratones ($n=5$ /grupo) se sacrificaron por dislocación cervical 7 días después de la última exposición i.n. al alérgeno. Los bazo se extirparon y se disgregaron mecánicamente, haciéndolos pasar a través de una malla metálica, en medio GKN completo. Después de una centrifugación a 500 *g* durante 10 min a 4°C, el sedimento celular se resuspendió suavemente y se incubó 7 min, a temperatura ambiente, con el tampón ACK (5 ml/bazo), agitándose ocasionalmente. Seguidamente, las células se lavaron dos veces con medio GKN completo, se resuspendieron en RPMI completo y se contaron al microscopio óptico con una cámara *Neubauer*. Todos los cultivos celulares se mantuvieron en RPMI completo, a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% (v/v). La viabilidad, en todos los casos, fue mayor del 80%.

Determinación de los niveles de citoquinas

Las células de bazo se cultivaron en placas de 48 pocillos (Costar), por cuadruplicado a una densidad de 5×10^5 células por pocillo en 500 µl de RPMI completo. Las células se estimularon con el antígeno (2 µg/ml) durante 48 ó 72 h, dependiendo de la citoquina a determinar. Transcurrido dicho tiempo, los sobrenadantes de los cultivos se recogieron con el fin de determinar los niveles de citoquinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e interferón (IFN)- γ . Como control positivo se utilizaron los sobrenadantes de células estimuladas con concanavalina A (Con A, 2 µg/ml, Sigma-Aldrich) y como control negativo los sobrenadantes de células no estimuladas.

La determinación de los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de ratón se realizó utilizando los *kits* de detección correspondientes, mediante ELISA en sándwich, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (BD Pharmigen). La sensibilidad del ensayo fue de 5 pg/ml para la IL-4, 15 pg/ml para la IL-5, 15 pg/ml para la IL-10, 30 pg/ml para la IL-13 y 25 pg/ml para el IFN- γ .

Proliferación de células T

Los cultivos de esplenocitos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con fondo redondo, por cuadruplicado, a una densidad de 2×10^5 células por pocillo en 200 µl de RPMI completo. Las células se estimularon con 2 µg/ml del antígeno durante 96 h. Como controles positivo y negativo se utilizaron células estimuladas con Con A (2 µg/ml) y sin estimular, respectivamente. La proliferación celular se determinó mediante la incorporación de timidina-³H (actividad específica 86 µCi/mmol, Amersham), tras añadir 1 µCi por pocillo del isótopo durante las últimas 16 h de cultivo. La incorporación de timidina-³H se analizó mediante un contador de radiactividad β y los resultados se expresaron en cuentas por minuto (c.p.m.). El índice de estimulación se calculó como el cociente entre las c.p.m. de las células estimuladas con el antígeno y no estimuladas.

Estudio de los niveles de mRNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

Aislamiento de RNA total

El RNA total fue aislado a partir del pulmón derecho y de bazo, tras homogeneizarlos en nitrógeno líquido, utilizando el *kit RNAqueous 4PCR* (Ambion), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La concentración de RNA se determinó mediante un espectrofotómetro *NanoDrop-100* (Thermo Scientific) en la Unidad de Genómica, del Parque Científico de Madrid (UCM, Madrid).

Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total aislado de bazo y pulmón (1 µg) utilizando el *kit Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación de cDNA mediante RT-PCR

Las secuencias de cDNA obtenidas se amplificaron por RT-PCR, usando cebadores específicos diseñados sobre las secuencias conocidas para la β -actina, ADAM-8, CCL11, IL-10 y TGF- β (**Tabla 12**). Todos los cebadores fueron sintetizados por Sigma-Aldrich. La amplificación del cDNA se realizó en un termociclador *ABI PRISM 7900* (Applied Biosystems) mediante el uso de la sonda *SYBR-Green PCR Master Mix* para RT-PCR (Applied Biosystems). La normalización de los datos se llevó a cabo utilizando los niveles de expresión del mRNA de la β -actina y los niveles relativos del mRNA de cada uno de los genes fueron calculados mediante el método del $\Delta\Delta C_T$. La amplificación del cDNA mediante RT-PCR se llevó a cabo en la Unidad de Genómica, del Parque Científico de Madrid (UCM, Madrid).

Tabla 12. Secuencia y características de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de RT-PCR.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Bases	Tm (°C)
β-actina antisense	5' GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTA 3'	22	66.7
β-actina sense	5' CACAGCTGAGAGGGAAATCGT 3'	21	65.5
ADAM-8 antisense	5' TGGAGGAGAAAGTGCAGAAGGA 3'	22	67.2
ADAM-8 sense	5' GTGTGGAGCGCTGACTGTGA 3'	21	66.5
CCL11 antisense	5' CATCTGTTGTTGGTGATTCTTTTGTA 3'	26	64.7
CCL11 sense	5' AAGAAGATCCCCAACACACTACTGA 3'	25	65.7
IL-10 antisense	5' TTTCTGGGCCATGCTTCTCT 3'	20	65.9
IL-10 sense	5' TGCCAAGCCTTATCGGAAAT 3'	20	65.4
TGF-β antisense	5' GCCGCACACAGCAGTTCTT 3'	19	66.6
TGF-β sense	5' CACCGGAGAGCCCTGGATA 3'	19	67.4

ADAM, A *disintegrin and metalloprotease domain*; CCL, *Chemokine Cys-Cys motif ligand*, también denominada eotaxina-1; IL, *interleuquina*; TGF, *factor de crecimiento transformante*; Tm, *temperatura de desnaturalización*.

BLOQUE II. NANOVESÍCULAS DE SECRECIÓN DERIVADAS DEL POLEN COMO VEHÍCULOS DE ALÉRGENOS

MATERIALES

Anticuerpos monoclonales y policlonales

Inmunodetección

Los sueros policlonales específicos para los alérgenos Ole e 1 (1/10.000), Ole e 2 (1/10.000), Ole e 3 (1/5.000), Ole e 9 (1/10.000), Ole e 11 (1/5.000) y Ole e 12 (1/20.000) fueron obtenidos en conejo en el laboratorio del Dr. Fernando Vivanco de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid). El anticuerpo policlonal anti-Bet v 1 (1/1.000) fue preparado en el laboratorio mediante inmunización de ratones BALB/c con el antígeno, según el protocolo descrito por Batanero *et al.* [2002]. Los anticuerpos monoclonales anti-Phl p 1 (1/1.000) y anti-IgE humana (1/5.000) fueron amablemente donados por la compañía ALK-Abelló. El anticuerpo monoclonal anti-pectina desesterificada JIM7 (1/20), producido en rata, fue donado por el Dr. Juan de Dios Alché del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC, Granada). Como anticuerpos secundarios se emplearon GAM-HRP (1/2.500, Pierce), GAR-HRP (1/3.000, Bio Rad) y el anticuerpo de rata anti-IgG de ratón (RAM, 1/5.000, Bio-Yeda) conjugado con HRP.

Inmunolocalización para TEM

Los anticuerpos primarios empleados fueron: el anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1 de ratón (1/500) [Fernández *et al.*, 1996], preparado en el laboratorio del Dr. Carlos Lahoz de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid) y el anticuerpo policlonal anti-Ole e 12 (1/50) de conejo. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (1/100) y anti-IgG de ratón (1/100) conjugados con oro coloidal de 30 nm, se obtuvieron de la compañía BB International.

Inmunolocalización para microscopía láser confocal (CLSM)

En este caso, se empleó como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal anti-Ole e 12 (1/100) de conejo. Como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (1/200, Molecular Probes).

Medios de germinación *in vitro* del polen

Angiospermas: Ácido bórico al 0.03% (p/v), nitrato potásico al 0.01% (p/v), sulfato magnésico al 0.02% (p/v), nitrato cálcico al 0.03% (p/v), sacarosa al 10% (p/v) y penicilina/estreptomicina/anfotericina B (100 U/ml, 100 µg/ml, 0.025 µg/ml, Lonza) [Alché *et al.*, 2004]. El medio se esterilizó mediante filtración por 0.22 µm.

Gimnospermas: Cloruro cálcico al 0.02% (p/v), ácido bórico al 0.02% (p/v), sacarosa al 12% (p/v) y penicilina/estreptomicina/anfotericina B [Hao *et al.*, 2005]. El medio se esterilizó mediante filtración por 0.22 µm.

Pacientes

Todos los pacientes firmaron un consentimiento de participación en el estudio aprobado por el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid, así como por los Hospitales de Basurto (Bilbao) y Ciudad de Jaén (Jaén).

Pruebas cutáneas y test de activación de basófilos

Los pacientes se diagnosticaron en base a la historia clínica de alergia al polen de olivo, pruebas cutáneas positivas y valores de CAP-FEIA (Pharmacia AB) positivos al polen de olivo (clases del 3 al 6). Como controles se utilizaron individuos no atópicos. Los pacientes fueron reclutados en el Hospital de Basurto.

En las inmunodetecciones se emplearon los sueros de pacientes que presentaban un historial clínico de sensibilización, pruebas cutáneas positivas y valores de RAST positivos (clases del 3 al 6) frente a olivo. Como control se utilizó el suero de un individuo no atópico. Los pacientes fueron reclutados en el Hospital de Ciudad de Jaén.

Polen

Los granos maduros del polen de olivo (*Olea europaea*) fueron suministrados por el Dr. Juan de Dios Alché del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC, Granada). El polen fue recolectado de olivos seleccionados, en la ciudad de Granada, durante el periodo de antesis en los años 2010 y 2011. Para ello, las inflorescencias se sometieron a fuertes sacudidas y los granos de polen se recogieron en bolsas de papel. El polen fresco se almacenó a -80°C hasta su uso. El polen de olivo comercial, suministrado por la compañía ALK-Abelló, fue almacenado al menos durante 5 años a -20°C .

Los pólenes de ballico (*Lolium perenne*) y abedul (*Betula verrucosa*) fueron amablemente cedidos por el Dr. Rafael I. Monsalve (ALK-Abelló, Madrid). El polen de pino (*Pinus sylvestris*) se obtuvo de la compañía Allergen Pollens (Madrid). Todos los pólenes se guardaron a -20°C hasta su uso.

MÉTODOS

Germinación *in vitro* del polen

El polen de olivo se prehidrató en una cámara húmeda durante 30 min a 30°C y en oscuridad. A continuación, los granos de polen hidratados (0.5% (p/v)) se espolvorearon sobre el medio de germinación específico de angiospermas, en placas Petri de 15 cm de diámetro (Dismadel). Con el fin de germinar los granos de polen, las placas se mantuvieron durante 16 h en oscuridad, sin agitación y a 30°C . En el caso de los pólenes de ballico y abedul el tiempo de germinación fue de 30 h.

Los pólenes de las gimnospermas difieren de las angiospermas tanto en sus requerimientos como en la tasa del crecimiento del tubo polínico, que es mucho más lenta. Así, la germinación *in vitro* del polen de pino se llevó a cabo en el medio de cultivo para gimnospermas durante 52 h a 27°C y en oscuridad.

Transcurrido el tiempo necesario para que al menos entre el 20% y el 65% de los granos estuviesen germinados, el medio de cultivo se centrifugó a 5.000 *g* durante 15 min a 4°C para eliminar los granos del polen. El sobrenadante se utilizó para el aislamiento de las NVS del polen, realizándose al menos 5 aislamientos independientes para cada uno de los pólenes analizados. Se usaron al menos 300

granos de polen para calcular la tasa de germinación y se consideró que éstos habían germinado cuando la longitud del tubo polínico era mayor que el diámetro del grano de polen [Rodríguez-Riano & Dafni, 2007].

Para los estudios de cinética de liberación de las NVS del polen de olivo, los granos se incubaron 0, 1, 4, 8, 16 y 32 h en medio de germinación. Los medios se emplearon para el aislamiento de las NVS. En algunos experimentos, el polen hidratado se lavó con H₂O antes de su incubación en el medio de germinación, para analizar la secreción de nanovesículas en dicha etapa. Así, el H₂O del prelavado se sometió al protocolo de purificación de NVS detallado a continuación.

Purificación de las NVS a partir del medio de germinación

Las NVS del polen se purificaron a partir del medio de germinación (o del H₂O) empleando el protocolo descrito en el apartado *Aislamiento de los exosomas a partir del BALF* de Materiales y Métodos (página 39). Brevemente, tras retirar el medio de germinación con cuidado, éste se centrifugó a 5.000 g durante 15 min a 4°C, para eliminar los posibles granos de polen contaminantes. El sobrenadante se filtró dos veces por 0.22 µm y el filtrado se ultracentrifugó a 100.000 g durante 75 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se guardó a 4°C para su posterior procesamiento y análisis, y el sedimento, correspondiente a NVS, se lavó tres veces con PBS mediante ultracentrifugación. Las NVS se resuspendieron en PBS (50 µl por cada 0.1 gr de polen) y se guardaron a -20°C hasta su uso. La cantidad de NVS aisladas se estimó determinando la concentración de proteína total mediante el *kit Micro BCA Protein Assay*.

El sobrenadante resultante de la primera ultracentrifugación, se aplicó en columnas PD-10 (Amersham), con el fin de eliminar la sacarosa presente en el medio de germinación. Seguidamente, se cuantificó la cantidad de proteína total, mediante el *kit Micro BCA Protein Assay*, se liofilizó y se guardó a -20°C hasta su uso.

Recolección del material biológico aerotransportado

La recolección del material biológico presente en el aire se llevó a cabo mediante un impactador de cascada Andersen (Andersen Inc.). En ellos las partículas atraviesan tubos progresivamente menores, por lo que se fraccionan en 8 estadios (del 0 al 6, y F) de acuerdo con su diámetro aerodinámico [De Linares *et al.* 2007]: estadio 0 (>9 µm), 1 (9-5.8 µm), 2 (5.8-4.7 µm), 3 (4.7-3.3 µm), 4 (3.3-2.1 µm), 5 (2.1-1.1 µm), 6 (1.1-0.7 µm) y F (<0.7 µm). De este modo, el recolector reproduce las características de fraccionamiento que tienen lugar en el aparato respiratorio de humanos, siendo la distribución de las partículas en los 8 estadios un indicador de su grado de penetración en el sistema respiratorio (**Figura 13**). Las muestras se recogieron en filtros de fibra de vidrio tipo GF/A de 1.6 µm (Whatman). El estudio se realizó en la ciudad de Granada durante el periodo de polinización del olivo de 2010 (1 y 2 de abril, 31 de mayo, 7, 8 y 9 de junio), siguiendo la metodología estándar propuesta por la Red Española de Aerobiología [Galán *et al.*, 2007]. Los filtros se recogieron cada 24 h y se guardaron a -20°C hasta su uso. La concentración de polen en la atmósfera se expresó como número de granos de polen por metro cúbico de aire aspirado. Estos estudios fueron realizados por la Dra. Concepción De

Linares del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (Granada).

Para el aislamiento de las NVS a partir de los filtros aerobiológicos, éstos se lavaron con 30 ml de PBS, en placas Petri durante 1 h y con agitación suave. Tras centrifugar a 5.000 g durante 15 min a 4°C, el sobrenadante se utilizó para el aislamiento de las NVS, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Como control se emplearon filtros no expuestos.

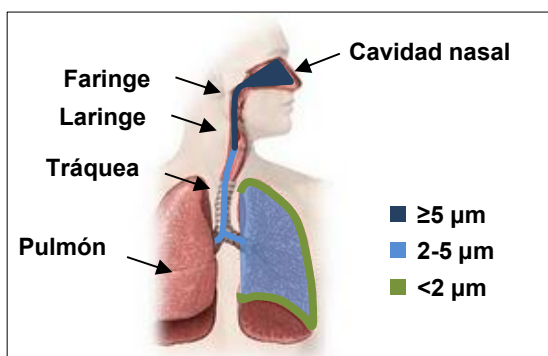


Figura 13. Depósito del aerosol atmosférico en las vías aéreas en función del tamaño de la partícula. Adaptado de Newman [1985].

Extractos de pólenes

Los extractos salinos de los pólenes de abedul, ballico, olivo y pino se prepararon según el protocolo descrito por Batanero *et al.* [1996b]. Los granos de polen se resuspendieron al 1% (p/v) en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0, conteniendo 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, la muestra se centrifugó a 16.000 g durante 20 min a 4°C, se recogieron los sobrenadantes obtenidos y el proceso de extracción se repitió otras 2 veces. Los sobrenadantes recogidos se reunieron, se liofilizaron y se conservaron a -20°C hasta su uso. La concentración de proteína total se determinó utilizando el *kit Micro BCA Protein Assay*.

Centrifugación en gradiente de sacarosa

Las NVS (50 µg) se resuspendieron en Tris-base-HCl 20 mM, pH 7.2 y se aplicaron sobre un gradiente de sacarosa (de 0 a 2 M), según el protocolo descrito en el apartado *Centrifugación en gradiente de sacarosa* de Materiales y Métodos (página 43). Las diferentes fracciones obtenidas se analizaron mediante TEM e inmunodetección, utilizando en el último caso los anticuerpos anti-Ole e 1, anti-Ole e 11, anti-Ole e 12 y anti-pectina desesterificada.

PAGE-SDS

Las electroforesis se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado *PAGE-SDS discontinua* de Materiales y Métodos (página 40). Las muestras (de 30 a 50 µg de proteína total) se disolvieron directamente en tampón de aplicación añadiéndose, en algunos casos, 2-ME al 5% (v/v). Las NVS se sometieron, además, a ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a 42°C. Antes de su aplicación, las muestras se calentaron a 95°C durante 10 min y se centrifugaron a 16.000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Los geles se emplearon para la visualización directa de proteínas o para la transferencia electroforética de las proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Las proteínas se detectaron directamente mediante tinción del gel con una solución que contenía azul de Coomassie (*Coomassie brilliant blue R-250*, Sigma-Aldrich) al 0.3% (p/v), en metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) [Fairbanks *et al.*, 1971]. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados sucesivos en ácido acético al 7.5% (v/v). Como patrones de peso molecular se utilizaron las proteínas contenidas en el *kit MW-SDS-70L* (Sigma-Aldrich). La estimación de la masa molecular aparente de las proteínas se realizó según el método descrito por Weber & Osborn [1969].

Transferencia electroforética y aplicación directa de proteínas a membranas de nitrocelulosa

La transferencia electroforética de las proteínas se llevó a cabo según el protocolo descrito en el apartado *Transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa* de Materiales y Métodos (página 41).

En los experimentos de *Dot blot*, las muestras se aplicaron directamente sobre membranas de nitrocelulosa empleando un sistema de 96 pocillos *Minifold I Dot-Blot System* (Whatmann).

Inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa

Después de la transferencia electroforética de las proteínas o de su aplicación directa sobre la membrana, se procedió a su inmunodetección siguiendo el protocolo descrito en el apartado *Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa* de Materiales y Métodos (página 42).

Después de bloquear la membrana, ésta se incubó con el anticuerpo primario durante 1 h, o con los sueros de los pacientes (1/10) durante 2 h. Tras el lavado, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (GAR-HRP, RAM-HRP o GAM-HRP) durante 1 h. En el caso de los sueros humanos, se empleó el anticuerpo monoclonal anti-IgE humana, antes de la incubación con GAM-HRP. Tras un lavado exhaustivo de la membrana, el revelado se llevó a cabo mediante el método del ECL.

Espectrometría de masas y secuenciación *de novo*

Las proteínas presentes en las NVS del polen de olivo (15 µg), fueron precipitadas con ácido tricloroacético al 6% (v/v) y 2 µl de una solución saturada de deoxicolato sódico [Casado-Vela *et al.*, 2006]. Posteriormente, el precipitado se lavó con acetona fría al 80% (v/v) y las proteínas fueron digeridas con tripsina según el protocolo descrito por Shevchenko *et al.* [1996]. Los péptidos resultantes de la digestión triptica fueron concentrados y desalados en una columna *Zorbax 300SB-C18* (5 x 0.3 mm y 5 µm de tamaño de partícula, Agilent Technologies). Seguidamente, los péptidos se separaron en una columna analítica *Zorbax 300SB RP C-18* (75 mm x 150 mm y 3.5 µm de tamaño de partícula), usando el sistema de HPLC *Agilent 1200* (Agilent Technologies). Se empleó un gradiente lineal del 5 al 40% (v/v) de acetonitrilo, conteniendo ácido fórmico al 0.1% (v/v), en 60 min. El flujo se mantuvo a 300 nl/min. Los péptidos se escanearon y se fragmentaron en un espectrómetro de masas *LTQ Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific). Los espectros se adquirieron entre 400-2000 *m/z*. El análisis se llevó a cabo en la base de datos NCBI nr (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA>), con 7.873.120 entradas. El *software SEQUEST* (Thermo Fisher Scientific) se empleó como sistema de búsqueda, utilizando los siguientes parámetros: (I) tripsina como enzima proteolítica, permitiendo una inespecificidad de reconocimiento de sitio de corte;

(II) carboxiamidometil-cisteína como modificación fija, y (III) oxidación de las metioninas, como modificación variable. Solo se aceptaron los fragmentos con una tolerancia en la medida de la masa del precursor de ± 5 ppm y ± 0.005 Da. Se estableció un filtro de confianza $<1\%$ de falsos positivos.

Para la secuenciación *de novo*, los espectros de los péptidos se adquirieron entre 400-2000 *m/z*, seguido de tres fragmentaciones en modo HCD (rango 100-2000 *m/z*). Los espectros fueron procesados con el *software* PEAKS v4.5 (www.bioinformaticssolutions.com). Solamente se consideraron válidos aquellos péptidos cuyas secuencias tuviesen un *score* igual a 50, con un valor de calidad de 0.75 y al menos cuatro aminoácidos con una confianza de secuencia $>99.5\%$. Los espectros de los fragmentos fueron también validados manualmente y las secuencias propuestas se confirmaron usando el *software* BlastP [Altschul *et al.*, 1997].

Los datos obtenidos se incluyeron en la base de datos de acceso público PRIDE tras su conversión a formato XML empleando el *software* PRIDE converter version 2.5.3. Para la preparación de las muestras, el análisis por espectrometría de masas y el procesamiento de los datos se siguieron las directrices recomendadas por la normativa MIAPE [Taylor *et al.*, 2007a]. Estos estudios fueron realizados por el Dr. Juan Casado-Vela de la Unidad de Oncología del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC, Madrid).

Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros de FTIR de las NVS del polen de olivo fueron adquiridos y procesados según el procedimiento detallado en el apartado *Espectroscopía de infrarrojo* de Materiales y Métodos (página 43). En este caso se utilizaron 20 μ l de una suspensión de NVS (0.5 μ g/ml) en agua. Para asegurar la reproducibilidad de las medidas, los espectros se adquirieron por triplicado, llevándose a cabo tres experimentos independientes.

TEM

Las NVS del polen (2 μ g) fueron fijadas en PBS-formaldehído al 2% (v/v) durante 16 h, a 4°C y en agitación. Tras dos lavados en fosfato sódico 10 mM, pH 7.0 mediante ultracentrifugación, las NVS se resuspendieron en 50 μ l del mismo tampón y se procesaron según el protocolo descrito en el apartado *Microscopía electrónica de transmisión (TEM)* de Materiales y Métodos (página 40).

Inmunolocalización de proteínas para TEM

La inmunolocalización de Ole e 12 en los granos de polen de olivo germinados *in vitro* se realizó según el protocolo descrito por Alché *et al.* [2004]. Tras centrifugar el medio de germinación a 5.000 *g* durante 10 min, los granos germinados se fijaron durante 16 h a 4°C con paraformaldehído al 4% (p/v) y glutaraldehído al 0.2% (v/v), en tampón cacodilato sódico 0.2 M, pH 7.2. Las muestras se deshidrataron mediante inmersión en una serie de soluciones de etanol de graduación creciente, se transfirieron gradualmente a óxido de propileno y se infiltraron en resina *Unicyl* (BB International). Las secciones ultrafinas (80 nm) se obtuvieron en un ultramicrotomo *Reichert-Jung* y se transfirieron a rejillas de níquel-carbono. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon mediante incubación de las secciones en PBS-BSA al 5% (p/v) durante 15 min. Seguidamente, las muestras se incubaron con el anticuerpo anti-Ole e

12 durante 2.5 h. Después de varios lavados con PBS, las rejillas se incubaron durante 2 h con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con oro coloidal. Tras 2 lavados con PBS y con agua destilada, las muestras se contrastaron con acetato de uranilo al 5% (p/v) durante 10 min. Las muestras se procesaron por duplicado y en los controles negativos se omitió el anticuerpo primario. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión *JEOL 1011* (JEOL), empleando un voltaje de trabajo de 80 kV.

Para la inmunolocalización del Ole e 1 y Ole e 12 en las NVS del polen, éstas se adsorbieron a rejillas de níquel-carbono según el protocolo descrito anteriormente. En el caso de la inmunolocalización de Ole e 1, las rejillas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-Ole e 1 de ratón, tras el bloqueo. Como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con oro coloidal. El contraste de las muestras de NVS se realizó por incubación con acetato de uranilo al 1% (v/v) durante 30 s.

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Dr. Juan de Dios Alché del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC, Granada).

Inmunolocalización de Ole e 12 para CLSM

La inmunolocalización de Ole e 12 en los granos de polen de olivo germinados *in vitro* se realizó según el protocolo descrito por Zienkiewicz *et al.* [2010]. El medio de germinación se centrifugó a 5.000 g durante 10 min, con el fin de separar los granos de polen germinados. Seguidamente, los granos de polen se fijaron en paraformaldehído al 4% (p/v) y glutaraldehído al 0.2% (v/v) en tampón cacodilato sódico 0.2 M, pH 7.2, durante 16 h a 4°C. Tras varios lavados, las muestras se digirieron con una mezcla de celulasa R10 al 1% (p/v) (Serva) y pectinasa (27 U/ml, Sigma-Aldrich) en tampón citrato 10 mM, pH 4.8, durante 30 min a 37°C. Tras varios lavados en el mismo tampón, las muestras se incubaron en PBS-BSA al 1% (p/v), durante 10 min a 4°C. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-Ole e 12, durante 16 h. Después de los lavados con PBS, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488, durante 2 h en oscuridad. Tras un lavado final en PBS, las muestras se transfirieron a la solución protectora de la fluorescencia *CITIFLUOR* (Sigma-Aldrich) y se observaron en un microscopio confocal Nikon C1, utilizando un láser de He/Ne (543 nm). En los controles negativos se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Dr. Juan de Dios Alché del Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental de Zaidín (CSIC, Granada).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Fragmentos de 0.5 cm² de los filtros aerobiológicos se pegaron sobre rejillas de aluminio que se metalizaron con oro para contrastar la superficie de las muestras. Las preparaciones se analizaron en un microscopio de barrido *JEOL 6400* (JEOL) con un voltaje de trabajo de 80 kV. La captura y procesamiento de las imágenes se llevó a cabo con el programa *INCA*. Las muestras analizaron en el centro de Microscopía Electrónica (UCM, Madrid).

Pruebas cutáneas

Las pruebas cutáneas se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Poulsen *et al.* [1993]. Se aplicaron 20 µl de una solución de NVS del polen de olivo (50 µg/ml) en PBS, sobre el antebrazo de pacientes alérgicos al polen de olivo ($n=4$). Como control positivo se empleó extracto comercial de polen de olivo a la concentración recomendada por el fabricante (100 IR). Como control negativo se utilizaron individuos no alérgicos ($n=2$). Tras 15 min, se midieron los diámetros máximos [longitudinal (D) y transversal (d)] de la pápula. La prueba cutánea se consideró positiva cuando la media del diámetro $[(D+d)/2]$ de la pápula inducida por el alérgeno fue $>3 \text{ mm}^2$. Los resultados fueron expresados en mm^2 . Estos ensayos fueron realizados por el Dr. Pedro Gamboa del Servicio de Alergia del Hospital de Basurto (Bilbao).

Test de activación de basófilos

El test de activación de basófilos se llevó a cabo según el protocolo descrito por De Week *et al.* [2008]. Se tomaron muestras de sangre periférica de individuos alérgicos al polen de olivo ($n=4$) e individuos no alérgicos ($n=2$). Las células sanguíneas se incubaron con diferentes concentraciones de NVS o de Ole e 1, en el rango de 25 a 0.25 µg/ml. La activación de basófilos se expresó en porcentaje, en base a los niveles de expresión de la molécula CD63 (BD Pharmigen) detectada mediante citometría de flujo. Como control positivo y negativo se emplearon anti-IgE humana y PBS (activación basal), respectivamente. Los ensayos fueron realizados por la Dr. M^a Luisa Sanz del Departamento de Alergología e Inmunología Clínica de la Clínica Universidad de Navarra (Pamplona).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE I. EXOSOMAS TOLEROGÉNICOS DERIVADOS DEL BALF COMO POSIBLE VACUNA NASAL PARA LA ALERGIA

ARTÍCULO I. EXOSOMAS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR DE RATONES TOLERANTES PREVIENEN LA REACCIÓN ALÉRGICA

Noela Prado, Eva G. Marazuela, Elodie Segura, Héctor Fernández-García, Mayte Villalba, Clotilde Théry, Rosalía Rodríguez y Eva Batanero.

Los exosomas son nanovesículas originadas en los cuerpos multivesiculares que son secretados por una gran variedad de tipos celulares. La doble capacidad de los exosomas para promover inmunidad o inducir tolerancia, ha llevado a proponerlos como vehículos de vacunación para uso clínico frente a diferentes enfermedades humanas. En el presente estudio, se determinó el efecto de los exosomas procedentes de ratones tolerantes en el desarrollo de una respuesta alérgica inducida por el alérgeno, empleando un modelo de ratón. Los ratones fueron tolerizados mediante exposición respiratoria al alérgeno del polen de olivo Ole e 1. Vesículas similares a exosomas se aislaron del lavado broncoalveolar de los animales mediante el procedimiento establecido de filtración/ultracentrifugación, se caracterizaron mediante microscopía electrónica, *Western blot* y FACS, y se evaluaron en un protocolo profiláctico. Con este fin, ratones BALB/c fueron tratados intranasalmente con exosomas tolerogénicos, o exosomas *naïve* como control, una semana antes de la sensibilización/provocación a Ole e 1. Se tomaron muestras de sangre y se extirparon los pulmones y los bazo, para analizar la respuesta inmune. La administración intranasal de los exosomas tolerogénicos inhibió *in vivo* el desarrollo de la respuesta IgE, la producción de citoquinas Th2 y la inflamación de las vías aéreas -características claves de la alergia-, y mantuvieron esta protección específica a largo plazo. Este efecto protector se asoció con un aumento concomitante en la expresión de la citoquina reguladora TGF- β . Estas observaciones demostraron que los exosomas pueden inducir tolerancia y protección frente a la sensibilización alérgica en ratones. Así, las vacunas basadas en exosomas podrían representar una alternativa a la terapia convencional para las enfermedades alérgicas en humanos.

The Journal of Immunology (2008) **181**:1519-1525.

Exosomes from Bronchoalveolar Fluid of Tolerized Mice Prevent Allergic Reaction¹

Noela Prado,* Eva G. Marazuela,* Elodie Segura,^{†‡} Héctor Fernández-García,[§] Mayte Villalba,* Clotilde Théry,^{†‡} Rosalía Rodríguez,* and Eva Batanero^{2*}

Exosomes are nanovesicles originating from multivesicular bodies that are secreted by a variety of cell types. The dual capability of exosomes to promote immunity or to induce tolerance has prompted their clinical use as vehicles for vaccination against different human diseases. In the present study, the effect of allergen-specific exosomes from tolerized mice on the development of allergen-induced allergic response was determined using a mouse model. Mice were tolerized by respiratory exposure to the olive pollen allergen Ole e 1. Exosome-like vesicles were isolated from bronchoalveolar lavage fluid of the animals by the well-established filtration and ultracentrifugation procedure, characterized by electron microscopy, Western blot, and FACS analyses, and assessed in a prophylactic protocol. To this end, BALB/c mice were intranasally treated with tolerogenic exosomes or naive exosomes as control, 1 wk before sensitization/challenge to Ole e 1. Blood, lungs, and spleen were collected and analyzed for immune responses. Intranasal administration of tolerogenic exosomes inhibited the development of IgE response, Th2 cytokine production, and airway inflammation—cardinal features of allergy—and maintained specific long-term protection in vivo. This protective effect was associated with a concomitant increase in the expression of the regulatory cytokine TGF- β . These observations demonstrate that exosomes can induce tolerance and protection against allergic sensitization in mice. Thus, exosome-based vaccines could represent an alternative to conventional therapy for allergic diseases in humans. *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 1519–1525.

Allergy is a major public health problem that affects the quality of life of millions of children and adults, and its prevalence has dramatically increased in many countries, particularly in industrialized ones, where it affects more than 25% of the population (1). In Mediterranean countries (2) and some areas of America, South Africa, Japan, and Australia, one of the most common causes of pollinosis is olive tree (*Olea europaea*) pollen. The main allergen of olive tree pollen is Ole e 1 (3), which has been described as a diagnostic marker for sensitization to *Oleaceae* pollens (4). Therefore, Ole e 1 has been selected as a model allergen for the development of novel therapeutic strategies for allergy.

Currently, allergen-specific immunotherapy is the only curative treatment available for allergic patients that results in immunological allergen unresponsiveness. Even though this treatment can offer protection, it faces several problems, such as long duration, anaphylactic side effects, and limited efficacy (5). Consequently, there is a clear need to develop alternative strategies to allergen-specific immunotherapy aiming to reinstate peripheral tolerance against allergens. Mucosal vaccines, which are based on the mucosal tolerance phenomenon, represent an alternative strategy to conventional immunotherapy (1). Studies in mouse models of allergy have revealed promising results on mucosal tolerance induc-

tion with allergens or their derivatives in prophylactic as well as therapeutic approaches (see Ref. 1 for review).

Exosomes are nanovesicles (30–100 nm in diameter) released by a variety of cell types, including dendritic cells (DCs),³ but they have also been isolated from several body fluids, such as serum, bronchoalveolar fluid (BALF), urine, tumoral effusions, sperm (see Refs. 6 and 7 for review), and breast milk (8). They form by inverse membrane budding into the lumen of late endosomes, which results in the formation of multivesicular bodies (MVBs). Fusion of the MVBs with the plasma membrane leads to the release of exosomes into the medium. Several studies have shown that exosomes display immunomodulatory properties, including both immune stimulation and immune suppression (named tolerogenic exosomes), because they act as Ag-bearing vehicles transferring Ags between cells. For example, DC-derived exosomes stimulate efficient antitumor immunity in animal models (9), and have already been successfully assessed in two phase I clinical trials for the treatment of patients with melanoma or with non-small cell lung carcinoma (10, 11). Regarding their immunosuppressive effects, recent studies have shown that exosomes from modified DCs can suppress both a delayed-type hypersensitivity response and collagen-induced arthritis in mouse models (12, 13). In addition, it also has been demonstrated that exosomes are able to induce donor-specific allograft tolerance (14). Also, tolerosomes, corresponding to exosome-like structures, are produced by intestinal epithelial cells and can induce tolerance to oral Ags (15, 16). On the basis of these and other studies, exosomes have been proposed as vehicles for vaccination against different human diseases. To date, there is just one report showing that B cell-derived exosomes

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Complutense, Madrid, Spain; [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 653, Paris, France; [‡]Institut Curie, Paris, France; and [§]Área de Histología y Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, Spain

Received for publication January 23, 2008. Accepted for publication May 12, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Grants SAF2002-02711 and SAF05-01847 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain) to R.R.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Eva Batanero, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: ameva@bbm1.ucm.es

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; EM, electron microscopy; Exo_{Con}, exosomes isolated from naive mice; Exo_{Tol}, exosomes isolated from mice tolerized against Ole e 1; i.n., intranasal; MVB, multivesicular body; SP-B, surfactant protein B.

can present allergen-derived peptides and stimulate allergen-specific T cells, suggesting that exosomes could play a role in allergy (17). Following the concept of tolerogenic exosomes, it would be interesting to investigate whether such vesicles could be the basis for a novel form of mucosal allergy vaccine for prophylaxis and therapy of individuals at risk or patients.

In the present study, the effect of allergen-specific exosomes from tolerized mice on the development of allergen-induced allergic response was determined using a mouse model. We demonstrate that intranasal (i.n.) administration of tolerogenic exosomes inhibited the classical pathology associated with allergy, namely IgE response, Th2 cytokine production, and airway inflammation.

Materials and Methods

Abs and reagents

Abs used for exosome characterization by Western blotting are as follows: rabbit anti-mouse MFGE-8 (lactadherin) serum prepared as previously described (18); monoclonal anti-mouse Alix/AIP1 (49 clone) and clathrin (23 clone) (BD Transduction Laboratories); mouse anti-flotillin-1 (18 clone) and rat monoclonal anti-mouse CD9 (KMC8 clone; BD Pharmingen); mouse anti-ICAM-1 (YN1/1.7.4 clone; Beckman Coulter); goat anti-tsg 101 (M-19 clone; Santa Cruz Biotechnology); hsc70 (1B5 clone) and gp96 (9G10 clone) (StressGen Biotechnologies); rabbit anti-sheep surfactant protein B (SP-B) polyclonal Ab (Chemicon International); and rabbit anti-Ole e 1 allergen serum prepared as previously described (19). HRP-conjugated secondary Abs were from Pierce. Abs used for FACS analysis were obtained from BD Pharmingen, as follows: FITC-conjugated anti-mouse I-A^d, H-2K^d; biotin-conjugated anti-mouse CD9 and ICAM-1; and PerCP-conjugated streptavidin.

Ole e 1 was purified from olive pollen, as described (3).

Mice

Female BALB/c mice (6–8 wk old) were obtained from Harlan Interfauna Ibérica. Animals were maintained at the Animal Care Services of the Faculty of Biology (Complutense University), according to the local guidelines for animal care and use. Experiments were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of Complutense University.

Sensitization and airway challenge

Mice were immunized by i.p. injection with 1 μ g of Ole e 1 in 2 mg of alum, in a volume of 150 μ l of PBS, twice at week intervals. After 7 days, mice received i.n. 10 μ g of Ole e 1 in 20 μ l of PBS on 3 consecutive days under anesthesia (19).

Prophylactic protocol

In a pilot experiment, several i.n. pretreatments were performed to find the optimal dose and time of Ag administration. Immunomodulation was achieved by i.n. application of 5 μ g of exosomal proteins divided on 3 doses on 3 consecutive days, and, therefore, it was chosen as the optimal protocol in the present study. Anesthetized mice were i.n. pretreated with exosomes from tolerized (Exo_{Tol}) or naive mice (Exo_{Con}). One week later, mice were sensitized, as described above (short-term protocol). For long-term experiments, Ole e 1 sensitization was started 10 wk after treatment. The experiments were performed with seven to eight mice/group and repeated two or three times to ensure reproducibility.

Induction of i.n. tolerance, collection of BALF, and exosome purification

Mice lightly anesthetized with ketamine/xylazine received i.n. Ole e 1 (100 μ g) in 20 μ l of PBS on 3 consecutive days (days 0, 1, and 2). Control mice received i.n. PBS. BALF was taken 24 h later (day 3). Animals were injected i.p. with a lethal dose of pentobarbital. After trachea cannulation, the lungs were lavaged with 1 ml of PBS three times, and the fluids were pooled.

Exosomes were isolated from BALF of tolerized or naive mice, as described previously, for exosomes (20). The protein content in exosome preparations was measured by the microbicinchoninic acid assay (Pierce Chemical). Exosomal proteins (10, 15, or 30 μ g) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting or coated on beads for FACS analysis, as described (20).

Electron microscopy (EM)

Exosomes fixed in 2% paraformaldehyde were loaded on copper-formvar/carbon-coated EM grids. Samples were contrasted in 2% uranyl acetate and observed at 80 kV with a JEOL1010 transmission electron microscope.

Sucrose gradient

Flotation of exosomes was performed on a linear 2 M to 0.25 M sucrose gradient by 18-h centrifugation at 100,000 \times g, as described (20). Pellets recovered from 0.5-ml fractions were analyzed by EM.

Lung histology

Lungs ($n = 2-3$ mice/group) were removed, washed with PBS, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were cut and stained with H&E for light microscopy. For each mouse, 10 airway sections, randomly distributed through the left lung, were assessed for severity/frequency of inflammatory response by morphometric analysis, by individuals blinded to the protocol design (semiquantitative scale ranging from 0 to 5⁺).

ELISA

Blood samples were collected from the retro-orbital plexus 7 days after the last immunization (terminal bleeding). Individual sera were prepared and stored at -20°C until used. Ole e 1-specific Abs were measured by ELISA, as previously described (21). Serum samples were diluted 1/25,000 for IgG1 and 1/400 for IgG2a. Ab levels were expressed as OD values at 492 nm. Total IgE (diluted 1/80) Abs were measured by a sandwich ELISA using the OptEIA mouse IgE set (BD Pharmingen), according to the manufacturer's instructions. In our mouse model, it has been shown that specific IgE levels in serum can be estimated by measuring total IgE (21).

Proliferation and cytokine assays

Seven days after the last immunization, spleens from Ole e 1-sensitized mice were removed aseptically, minced, and filtered through sterile filters, and a cell suspension was prepared, as described (21).

For T cell proliferation assays, spleen cells (2×10^5 cells/well, 0.2 ml/well) were stimulated with Ole e 1 (2 μ g/ml) for 96 h in 96 round-bottom plates (Costar). The cultures were pulsed with 1 μ Ci/well [³H]thymidine (Amersham) during the last 16 h of culture. Cells were harvested on microbeta filter mats using a 96-well harvester, and proliferative responses were measured by beta plate scintillation counting. The stimulation index was calculated as the ratio of cpm of the unstimulated control and allergen-stimulated cells.

To measure cytokine production, spleen cells were cultured in 48-well plates (Costar) at 10^7 cells/ml (0.5 ml/well) and stimulated with Ole e 1 (2 μ g/ml). Supernatants were taken after 48 or 72 h and stored at -20°C until analysis. Levels of IL-4, IL-5, IL-10, and IFN- γ were measured by ELISA kits (BD Pharmingen). Values in pg/ml were calculated according to standard curves obtained with recombinant mouse cytokines. The sensitivity of the assays was 5 pg/ml for IL-4, 60 pg/ml for IL-5, 15 pg/ml for IL-10, and 25 pg/ml for IFN- γ .

RNA isolation and real-time PCR assays

Lungs and spleens were homogenized, and total RNA was isolated using RNeasy-4PCR kit (Ambion Europe), according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was done using Superscript first-strand synthesis system for real-time PCR (Invitrogen). Primers specific for IL-10 (forward, 5'-TGCCAAGCCTTATCGGAAAT-3'; reverse, 5'-TTTCTGGGC CATGCTTCTCT-3'), TGF- β (forward, 5'-CACCGGAGAGCCCTGGATA-3'; reverse, 5'-GCCGCACACAGCAGTTCTT-3'), and β -actin (forward, 5'-CACAGCTGAGAGGAAATCGT-3'; reverse, 5'-GCCATCTCCTGCTCG AAGTCTA-3') were designed and synthesized by Sigma-Aldrich. Real-time analysis was performed on an ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix for real-time PCR (Applied Biosystems). After normalization of the data according to the expression of β -actin mRNA, relative levels of cytokine mRNA were calculated using the $\Delta\Delta C_T$ method.

Statistical analysis

Data are given as means \pm SEM from two (long-term) or three (short-term) independent experiments. Statistical analyses were performed by using Mann-Whitney U test (nonparametric) or Student's *t* test (parametric).

Results

Characterization of mouse BALF-derived exosomes

To examine the immunosuppressive properties of exosomes, a mouse model of tolerance to the allergen Ole e 1 was established,

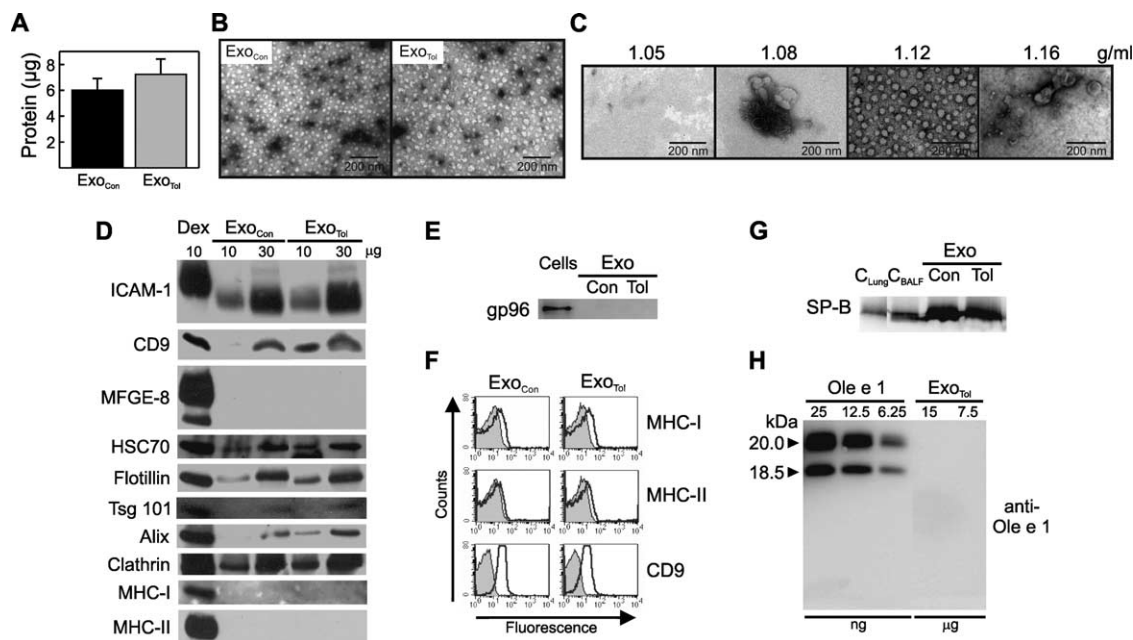


FIGURE 1. BALF-derived exosomes from tolerized mice are similar to those derived from naive mice. **A**, Relative exosome production in tolerized (Exo_{Tol}) vs naive mice (Exo_{Con}) calculated as μg of total exosomal protein per mouse. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 20$ mice/group) from eight independent experiments. **B**, Electron micrographs of exosomes from tolerized or naive mice. **C**, Analysis of exosomes on sucrose gradient by EM. **D**, Western blot analysis for the presence of exosomal proteins in BALF-derived exosomes compared with those derived from DC (Dex). **E**, Similar experiment for the expression of gp96 in BALF cell lysate (30 μg) and both types of exosomes (30 μg). **F**, Flow cytometric analysis for the surface expression of MHC-I, MHC-II, and CD9 in exosomes from BALF. Shaded histograms indicate isotype controls. **G**, Western blot analysis for the presence of SP-B in BALF-derived exosomes (15 μg) compared with lung (C_{Lung}) and BALF (C_{BALF}) cell lysates (15 μg). **H**, Presence of Ole e 1 in Exo_{Tol} . Bands correspond to the glycosylated (20-kDa) and nonglycosylated (18.5-kDa) forms of Ole e 1.

involving repeated i.n. administration of Ole e 1 (our unpublished data). Exosome-like vesicles were isolated from BALF of tolerized (Exo_{Tol}) or naive animals (Exo_{Con}), as control, by the well-established filtration and ultracentrifugation procedure (20). To confirm that the vesicles recovered were typical exosomes, they were characterized by EM, flotation on a sucrose gradient, Western blot, and FACS analysis. Typically, 5–8 μg of exosomal proteins was isolated per mouse. No significant differences were detected in the purification yield of BALF-derived exosome-like vesicles from tolerized mice compared with naive animals (Fig. 1A). EM analysis of BALF-derived Exo_{Tol} showed round-shaped vesicles of 30–45 nm in diameter (Fig. 1B). These vesicles were morphologically similar to those isolated from naive mice. Exosome-like vesicles floated on a continuous sucrose gradient at density close to 1.12 g/ml (Fig. 1C). No exosome-like vesicles were detected on lower or higher density fractions. Western blot (Fig. 1, D and E) and FACS (Fig. 1F) analyses showed that BALF-derived exosome-like vesicles from mice tolerized to Ole e 1 and control mice were positive for typical exosomal proteins, especially those involved in MVB formation such as tsg101 and Alix, and

also contained proteins identified in the well-characterized DC-derived exosomes (22), i.e., MHC-I (Fig. 1F), ICAM-1, CD9, hsc70, flotillin, and clathrin (Fig. 1D), but negative for proteins not found in exosomes, such as gp96, a resident protein of endoplasmic reticulum (Fig. 1E). We also observed that BALF-derived exosome-like vesicles expressed no detectable levels of MHC-II (Fig. 1F), nor MFGE-8 (Fig. 1D), two abundant proteins on DC-derived exosomes, suggesting that DCs are not the major source of the vesicles present in BALF: other airway cells could be the sources of BALF-derived exosomes.

To analyze whether epithelial lung cells were the source of BALF-derived exosomes, the expression of SP-B, a specific surfactant protein that is synthesized in alveolar type II cells (23), on BALF-derived exosomes was analyzed by Western blot (Fig. 1G). SP-B was identified in lung and BALF cells, as expected, and on both types of BALF-derived exosomes. This result shows that type II cells are the main source of BALF-derived exosomes.

The presence of Ole e 1 in Exo_{Tol} was analyzed by Western blot using a polyclonal Ab against this allergen (Fig. 1H). No detectable

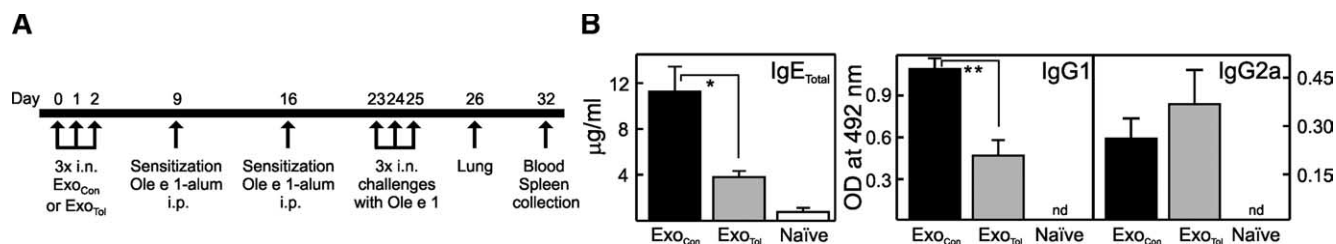


FIGURE 2. BALF-derived Exo_{Tol} inhibit synthesis of IgE and induce IgG2a in a mouse model of allergic sensitization. **A**, Experimental protocol used. **B**, Serum levels of Ole e 1-specific IgE, IgG1, and IgG2a determined by ELISA. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 15$ mice/group) from three separate experiments. *, $p < 0.001$ and **, $p < 0.001$ compared with sham-pretreated mice. Exo_{Con} , animals pretreated with naive exosomes; Exo_{Tol} , mice pretreated with tolerogenic exosomes.

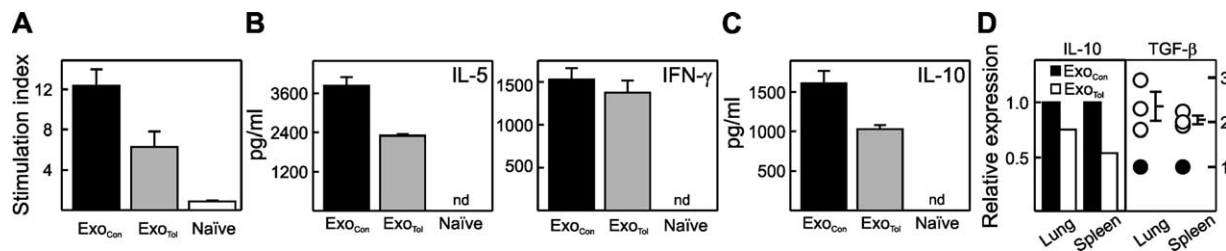


FIGURE 3. T cell reactivity to Ole e 1 in spleen cell cultures from mice pretreated with Exo_{Tol}. **A**, Proliferate responses. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group). **B**, IL-5 and IFN- γ (**B**) and IL-10 (**C**) production determined by ELISA. Results are shown as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group). **D**, Expression of IL-10 and TGF- β mRNA in lung and spleen as determined by RT-PCR. Values were normalized over those of the housekeeping gene actin, and expressed as a fold change, compared with Exo_{Con}-pretreated mice defined as 1. For TGF- β mRNA, data of three independent experiments are presented as scattered plot. Data are representative of three independent experiments.

levels of the allergen, as intact protein or as large processed fragments, were found in Exo_{Tol}.

Therefore, although the size and density of BALF-derived vesicles are slightly smaller (30–45 nm instead of 50–100 nm) and lower (1.12 g/ml instead of 1.13–1.20 g/ml), respectively, than those generally described for exosomes (20), these values have been reported for other exosomes (24). Furthermore, our vesicles display the typical protein composition of exosomes, especially a signature enrichment in MVB-associated proteins. Thus, we will refer to these vesicles as BALF-derived exosomes throughout this work.

Tolerogenic exosomes inhibit both specific IgE and IgG1 Abs in an allergic sensitization model

We examined whether BALF-derived exosomes from Ole e 1-tolerized mice may serve as a preventive vaccine for allergy in a mouse model of allergy induced by Ole e 1/alum sensitization, followed by airway challenges. Mice were i.n. pretreated with tolerogenic or naive exosomes, as sham-pretreated controls, before sensitization with Ole e 1, and the allergen-specific response was analyzed (Fig. 2A). Sham-pretreated animals developed an allergic state comparable to that observed in untreated mice sensitized and challenged with the allergen (data not shown). Intranasal pretreatment with Exo_{Tol} reduced IgE Ab levels as compared with the sham-pretreated controls (Fig. 2B). A reduction of specific IgG1 Ab levels was also observed in Exo_{Tol}-pretreated animals. By contrast, specific IgG2a Ab levels were not significantly changed by the pretreatment with Exo_{Tol} compared with the sham-pretreated group.

Pretreatment with tolerogenic exosomes inhibits Th2 cytokines, but induces TGF- β

To determine the effect of the pretreatment with Exo_{Tol} in the T cell response, cytokine production (IL-4, IL-5, and IFN- γ) and

lymphoproliferative response were measured in pooled spleen cell cultures with or without Ole e 1.

The lymphoproliferative response to Ole e 1 was inhibited in the cultures of Exo_{Tol}-pretreated mice compared with that of sham-pretreated group (Fig. 3A). IL-5 production was significantly reduced in spleen cell cultures of mice pretreated with Exo_{Tol} in comparison with the sham-pretreated controls (Fig. 3B). No significant changes were detected in IFN- γ levels in spleen cell cultures of these animals. In these experiments, IL-4 could not be detected in vitro under similar conditions, probably due to either insufficient secretion or too rapid use by these cells.

To determine whether suppression of experimental allergy in Exo_{Tol}-pretreated mice was associated with the production of regulatory cytokines, the levels of IL-10 in spleen cell cultures were determined by ELISA. As shown in Fig. 3C, IL-10 production was decreased in mice pretreated with Exo_{Tol} as compared with the control group. In addition, TGF- β and IL-10 mRNA expressions were determined by RT-PCR in lung and spleen tissues. Mice i.n. pretreated with Exo_{Tol} displayed a 2-fold increase of TGF- β mRNA in lung and spleen tissues compared with sham-pretreated controls (Fig. 3D). Regarding IL-10, mRNA levels were reduced compared with those of sham-pretreated controls in both tissues.

Tolerogenic exosomes reduce allergen-induced airway inflammation in mice

To assess the effects of the i.n. pretreatment with Exo_{Tol} in airway inflammation, lung histology was examined for each experimental group 24 h following the last i.n. Ole e 1 challenge. Histological examination revealed that i.n. pretreatment with Exo_{Tol} significantly reduced inflammatory cell infiltration into the lung after Ole e 1 challenge compared with sham-pretreated controls (Fig. 4).

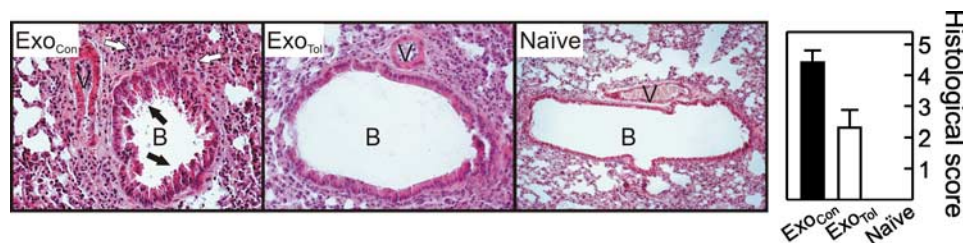


FIGURE 4. Exo_{Tol} pretreatment inhibits airway inflammation. Representative lung sections stained with H&E. Exo_{Con}, lung parenchyma from Ole e 1-sensitized mouse that has received Exo_{Con}, showing numerous inflammatory cells surrounding the airways and vessels (open arrow), and bronchiolar epithelium showing hyperplastic columnar epithelial cells (filled arrows); Exo_{Tol}, bronchiolar mucosa consist of low cuboidal epithelium with minimal cellular infiltration and scarce eosinophils of an Ole e 1-sensitized mouse that has received Exo_{Tol}; Naïve, lung tissue from untreated control mouse showing normal airway and surrounding parenchyma, and absence of peribronchiolar inflammatory infiltrates. Magnifications: $\times 20$ (Exo_{Tol} and Exo_{Con}); $\times 10$ (Naïve). Data are representative of three independent experiments ($n = 2$ –3 mice/group). B, bronchium; V, blood vessel.

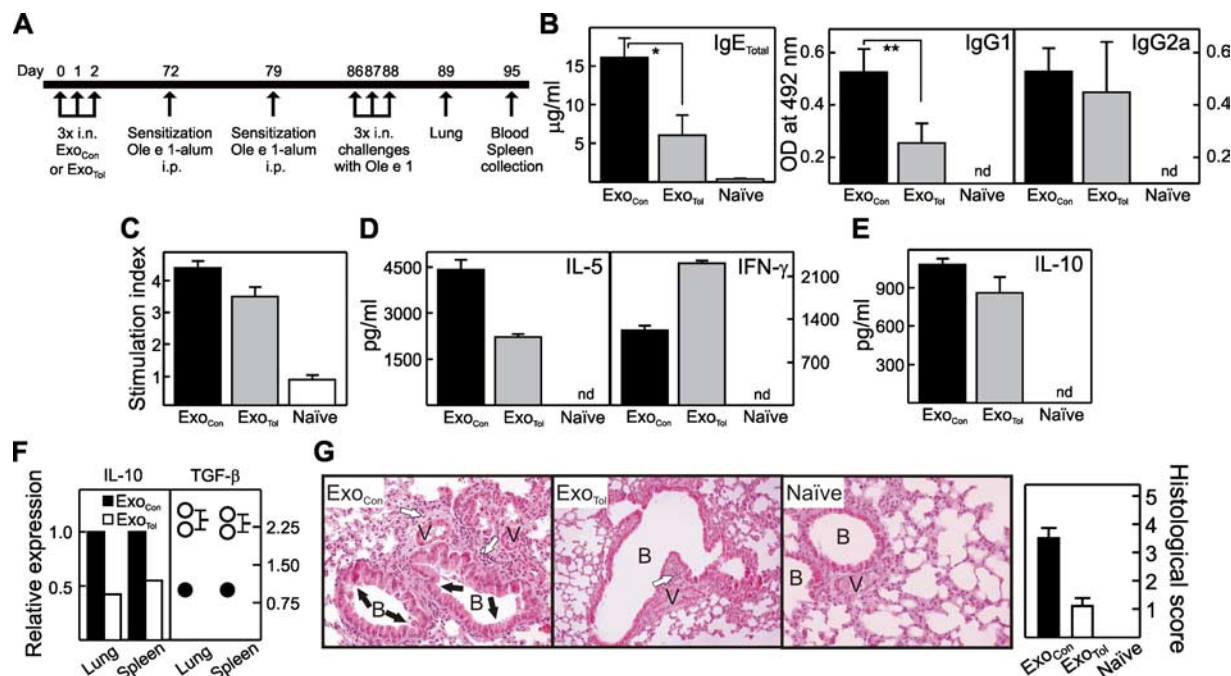


FIGURE 5. Exo_{Tol} pretreatment induces long-lasting protection against Ole e 1 sensitization. *A*, Experimental protocol used. *B*, Serum levels of Ole e 1-specific IgE, IgG1, and IgG2a determined by ELISA. Data are expressed as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group). *, $p < 0.03$ and **, $p < 0.05$ compared with sham-pretreated mice. Proliferative response (*C*) and cytokine production (*D* and *E*) in spleen cell cultures stimulated in vitro with Ole e 1. Results are shown as means \pm SEM ($n = 5$ mice/group). *F*, Expression of IL-10 and TGF- β mRNA in lung and spleen after i.n. pretreatment with Exo_{Tol} determined by RT-PCR. Values were normalized over those of the housekeeping gene actin, and expressed as a fold change, with values from Exo_{Con}-pretreated mice defined as 1. For TGF- β mRNA, data of two independent experiments are presented as scattered plot. *G*, Representative photomicrographs of lung sections from each group ($n = 2$ mice/group). Magnifications: $\times 20$ (Exo_{Tol} and Naïve); $\times 10$ (Exo_{Con}). Open arrows, areas with cellular infiltration. Filled arrows, hyperplastic bronchiolar epithelium. B, bronchium; V, blood vessel. Data are representative of two independent experiments.

The influx of eosinophils into the lung was suppressed for 50% by exosome pretreatment. No mucus secretion was observed.

Tolerogenic exosomes induce long-lasting protection against allergic sensitization

To examine whether exosome pretreatment induces a suppressive memory response, animals were sensitized 10 wk after pretreatment (Fig. 5A).

Ole e 1-specific Ab levels in serum. In the long-term protocol, Exo_{Tol} pretreatment suppressed serum-specific IgE and IgG1 Ab levels to the same extent as after short-term protocol compared with sham-pretreated controls (Fig. 5B). No significant changes were observed in specific IgG2a Ab levels after a long-term interval.

Proliferative response and cytokine production. In mice that received Exo_{Tol} pretreatment, proliferative response was suppressed compared with that of the sham-pretreated controls (Fig. 5C). Intranasal pretreatment with Exo_{Tol} resulted in a significant reduction of IL-5 levels (Fig. 5D), whereas a decrease was detected on IL-10 production (Fig. 5E). In contrast, IFN- γ was increased in cell cultures of mice i.n. pretreated with Exo_{Tol} compared with the sham-pretreated mice (Fig. 5D).

IL-10 and TGF- β mRNA. As Fig. 5F shows, after long-term protocol, Exo_{Tol} pretreatment also increased TGF- β mRNA expression, compared with sham-pretreated controls, in both lung and spleen. IL-10 mRNA levels were reduced compared with those of i.n. sham-pretreated controls.

Airway inflammation. After a long-term protocol as well as after short-term, lung cell infiltration was decreased as compared with sham-pretreated mice, and this was accompanied by an inhibition of eosinophil influx (Fig. 5G).

From these data, it can be inferred that Exo_{Tol} pretreatment induced a suppressive memory response, and TGF- β may be a mediator of this effect in this mouse model of allergy.

Discussion

In this study, we have demonstrated that i.n. administration of BALF-derived Exo_{Tol} induces tolerance and protects against allergic sensitization. One of the main advantages of the i.n. exosome-based vaccine is its potentiality to suppress two important clinical features of allergy, as follows: IgE Ab levels in serum and airway inflammation.

BALF cells appeared to secrete exosome-like vesicles as defined by morphological and biochemical criteria. Exosome-like vesicles were homogenous in size and floated with a sucrose gradient of 1.12 g/ml, which fits with the density reported for exosomes (1.11–1.21 g/ml) (24). Moreover, BALF-derived exosomes bear MHC-I, tetraspanin CD9, hsc70, flotillin, tsq101, Alix, and clathrin, a defined set of cellular proteins found in exosomes produced by other cells, but no MFG-8 (for review, see Ref. 25). These data allowed us to identify these BALF-derived vesicles as exosomes. BALF-derived exosomes from mice show differences in protein content compared with DC-derived exosomes. BALF-derived exosomes showed low levels of MHC-I and do not appear to express MHC-II, at least with the detection limits of Western blot and flow cytometry used in this study. It was unexpected that BALF-derived exosomes from mice do not bear MHC class II molecules because these molecules have been found in exosomes from human BALF (26). This is supported by the presence of MHC class II^{low/-} exosomes reported in human breast milk (8). They also showed SP-B, a specific protein of pulmonary surfactant that is synthesized in alveolar epithelia type II cells (23), suggesting that these cells could be the main source of BALF-derived exosomes. In addition

to its function in the regulation of lung homeostasis, type II cells have broad-ranging roles in the modulation of the activity of adjacent cell populations, including immune cells (27). Most recently, Lo et al. (28) have proposed that alveolar epithelia type II cells protect the lung from unwanted inflammatory responses, such as allergic reactions, by tolerizing T cells to potentially innocuous Ags as allergen. Based on these studies and taking into account the immunomodulatory properties of exosomes and their presence in human BALF, we proposed that type II cells, indirectly, can regulate the immune response in the lung by releasing exosomes. Exosomes released from different cellular sources may also have a role in allergy (for review, see Ref. 29). B cell-derived exosomes can present allergen-derived peptides and stimulate allergen-specific T cells, suggesting that exosomes could play a role in allergy (17). Furthermore, it has been suggested that exosomes from mast cells may regulate the allergic immune response by the restoration of the Th1/Th2 balance (for review, see Ref. 30), because they preferentially induce Th1-type responses (30–32). In this context, it deserves to mention that immunosuppressive effects mediated by mast cells have been reported in a delayed-type hypersensitivity response model (33).

The prophylactic capacity of exosomes produced by BALF cells was tested in the mouse model of Ole e 1-allergic sensitization. Mice pretreated with tolerogenic exosomes were protected against subsequent sensitization/challenge with the allergen and maintained long-term specific protection. The observed prophylactic effect is not due to contamination in the exosome preparation because control exosomes derived from naive mice were not able to confer any prophylactic effect. The efficiency of exosomes in preventing Ole e 1 sensitization could be due to both the presence of allergen and/or allergen-derived peptides on exosomes (Ag specific) and the exosome phenotype (nonspecific). Thus, if Ole e 1 is present in exosomes, it must be at level below detection threshold, and/or as processed form, such as MHC-I- or hsc70-peptide complexes. In this respect, it has been proposed that heat shock protein-peptide complexes play a role in cross-presentation (for review, see Ref. 34). Exosomes may be involved in both direct and cross-presentation of Ags to T cells. Because exosomes act as a system of antigenic spreading and amplification of immune response, this could explain why low amounts of antigenic peptides on exosomes are highly efficient in prevention against allergic sensitization. The fact that Exo_{Tol}, but not Exo_{Con}, protects mice from allergic sensitization allows us to suggest that the tolerogenic effect of Exo_{Tol} is due to intrinsic properties of these exosomes, rather than to the i.n. route of administration. Preliminary studies performed by our group using the same prophylactic approach support this idea; we found that i.n. pretreatment with BALF-derived exosomes from sensitized mice exacerbated specific Th2 response instead of suppressing it as Exo_{Tol} does (N. Prado, C. Théry, M. Villalba, R. Rodríguez, and E. Batanero, unpublished data). These results are in agreement with the observation that the protein content of exosomes varies depending on the origin and the physiological state of the cell, and these differences can be related to their different functions (22). In addition, the lipid composition of exosomes may also contribute to their immunomodulatory properties because it has been shown that exosomes can also be distinguished by their lipid content (35) and lipids act as adjuvants. Moreover, it would be of interest to investigate whether tolerance induction with Exo_{Tol} is associated with bystander suppression to an unrelated allergen (36).

In this setting, the increased levels of the suppressive cytokine TGF- β are associated with the Exo_{Tol}-mediated suppression effect, suggesting that this immunoregulatory cytokine could play a role in the suppression of the allergic response observed in this model.

In addition, IFN- γ could also play a role in the suppression of Th2 immune response and airway inflammation because its levels are high in the tolerized mice. In support of this idea, the immunosuppressive properties of this cytokine have been shown in vivo because it confers protection from autoimmune and allergic diseases (37–40). Although the interplay between IFN- γ and TGF- β , which mediate the suppression of the allergic response in mice that have been pretreated with Exo_{Tol}, remains open, Myers et al. (41) reported that CD8⁺ regulatory T cells require IFN- γ to generate a TGF- β -based suppression. This hypothesis is the aim of another investigation.

The potent in vivo immunosuppressive effects of tolerogenic exosomes from BALF support the role of these vesicles as Ag-transferring units between immune cells, contributing to amplify specific immune responses. It is possible that BALF-derived exosomes could modulate, either directly or indirectly, the activity of both DCs and T cells, rendering them able to confer protection against allergic sensitization. It is unclear whether exosomes can directly activate T cells, because several studies have indicated that efficient activation of T cells by exosomes requires recapture by APCs (22, 42–44). The present model should provide a useful tool for addressing these important issues in future research.

The strong immunosuppressive effects on the allergic response point to considering i.n. exosomes-based vaccination as an alternative to treat allergic diseases. In this respect, we have previously described in the mouse model of Ole e 1 sensitization (using the same prophylactic protocol) that i.n. administration of free Ole e 1 or a peptide-T of the allergen, free or encapsulated into poly(lactide-co-glycolide) microparticles, prevents allergic sensitization (19, 45). Although all of the prophylactic approaches suppress the most important clinical features of allergy (but using different mechanisms), exosomes have several advantages over the previous reported vaccines. They are acellular structures, but contain a wide array of cellular proteins, some of which modulate immune responses. Exosomes are natural Ag-transferring units between immune cells, allowing cross-presentation and contributing to amplify immune responses. These vesicles are rather stable and reduce the dose of Ag required to induce an immune response. Moreover, exosome display technology permits manipulation of their protein composition and tailoring for different functions (46). Despite the clinical relevance to test the therapeutic effects of Exo_{Tol}, the possibility of using prophylactic allergy vaccines for early prevention in atopic individuals or children at risk has been proposed (1, 47, 48). Further studies are required if prophylactic and therapeutic exosomes-based vaccination strategies are to be developed against allergy.

Acknowledgments

We thank Julio Paredes from Rey Juan Carlos University for histology preparations, and Agustín Fernández from Complutense University for EM assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Wiedermann, U. 2005. Prophylaxis and therapy of allergy by mucosal tolerance induction with recombinant allergens or allergen constructs. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4: 577–583.
2. Liccardi, G., M. D'Amato, and G. D'Amato. 1996. *Oleaceae* pollinosis: a review. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 111: 210–217.
3. Villalba, M., E. Batanero, C. López-Otín, L. M. Sánchez, R. I. Monsalve, M. A. González de la Peña, C. Lahoz, and R. Rodríguez. 1993. The amino acid sequence of Ole e 1, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur. J. Biochem.* 216: 863–869.
4. Palomares, O., I. Swoboda, M. Villalba, N. Balic, S. Spitzauer, and R. Rodríguez. 2006. The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to *Oleaceae*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 141: 110–118.

5. Akdis, C. A. 2006. Future of allergen-specific immunotherapy: better understanding of the mechanism, novel treatments, and long-term-cure. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 26: 13–22.
6. F  vier, B., and G. Raposo. 2005. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 415–421.
7. Barral, A. M., and M. G. von Herrath. 2005. Exosomes: specific intercellular nano-shuttles. *Curr. Immunol. Rev.* 1: 1–6.
8. Admyre, C., S. M. Johansson, K. R. Qazi, J.-J. Fil  n, R. Lahesmaa, M. Norman, E. P. A. Neve, A. Scheynius, and S. Gabrielsson. 2007. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J. Immunol.* 179: 1969–1978.
9. Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4: 594–600.
10. Escudier, B., T. Dorval, N. Chaput, F. André, M. P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulleux, C. Borg, S. Amigorena, et al. 2005. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC)-derived exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl. Med.* 3: 10.
11. Morse, M. A., J. Garst, T. Osada, S. Khan, A. Hobeika, T. M. Clay, N. Valente, R. Shreeniwas, M. A. Sutton, A. Delcayre, et al. 2005. A phase I study of dexamethasone immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Transl. Med.* 3: 9.
12. Kim, S.-H., E. R. Lechman, N. Bianco, R. Menon, A. Keravala, J. Nash, Z. Mi, S. C. Watkins, A. Gambotto, and P. D. Robbins. 2005. Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 174: 6640–6648.
13. Kim, S.-H., N. Bianco, R. Menon, E. R. Lechman, W. J. Shufesky, A. E. Morelly, and P. D. Robbins. 2006. Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Mol. Ther.* 13: 289–300.
14. P  che, H., K. Renaudin, G. Beriou, E. Merieau, S. Amigorena, and M. C. Cuturi. 2006. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am. J. Transplant.* 6: 1541–1550.
15. Karlsson, M. R., S. Lundin, U. I. Dahlgren, H. Kahu, I. Pettersson, and E. Telemo. 2001. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 31: 2892–2900.
16.   stman, S., M. Taube, and E. Telemo. 2005. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* 116: 464–476.
17. Admyre, C., B. Bohle, S. M. Johansson, M. Focke-Tejkl, R. Valenta, A. Scheynius, and S. Gabrielsson. 2007. B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 1418–1424.
18. Silvestre, J. S., C. Th  ry, G. Hamard, J. Boddaert, B. Aguilar, A. Delcayre, C. Houbbron, R. Tamarat, O. Blanc-Brude, S. Heeneman, et al. 2005. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat. Med.* 11: 499–506.
19. Marazuela, E. G., R. Rodríguez, H. Fernández-García, S. García, M. Villalba, and E. Batanero. 2008. Intranasal immunization with a dominant T-cell epitope peptide of a major allergen of olive pollen prevents mice from sensitization to the whole allergen. *Mol. Immunol.* 45: 438–445.
20. Th  ry, C., S. Amigorena, and G. Raposo. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. In *Current Protocols in Cell Biology*. J. S. Bonifacino, M. Dasso, J. B. Harford, J. Lippincott-Schwartz, and K. M. Yamada, eds. John Wiley & Sons, New York, pp. 3.22.1–3.22.29.
21. Batanero, E., P. Barral, M. Villalba, and R. Rodríguez. 2002. Sensitization of mice with olive pollen allergen Ole e 1 induces a Th2 response. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 127: 269–275.
22. Segura, E., C. Nicco, B. Lombard, P. V  ron, G. Raposo, F. Batteux, S. Amigorena, and C. Th  ry. 2005. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106: 216–223.
23. Haagsman, H. P., and R. V. Diemel. 2001. Surfactant-associated proteins: functions and structural variations. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 129: 91–108.
24. Valadi, H., K. Ekström, A. Bossios, M. S  jstrand, J. J. Lee, and J. O. L  tvall. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 654–659.
25. Th  ry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena. 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 569–579.
26. Admyre, C., J. Grunewald, J. Thyberg, S. Gripenb  ck, G. Tornling, A. Eklund, A. Scheynius, and S. Gabrielsson. 2003. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur. Respir. J.* 22: 578–583.
27. Fehrenbach, H. 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir. Res.* 2: 33–46.
28. Lo, B., S. Hansen, K. Evans, J. K. Heath, and J. R. Wright. 2008. Alveolar epithelial type II cells induce T cell tolerance to specific antigen. *J. Immunol.* 180: 881–888.
29. Admyre, C., E. Telemo, N. Almqvist, J. L  tvall, R. Lahesmaa, A. Scheynius, and S. Gabrielsson. 2008. Exosomes: nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy* 63: 404–408.
30. Stelekati, E., Z. Orinska, and S. Bulfone-Paus. 2007. Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. *Immunobiology* 212: 505–519.
31. Skokos, D., S. Le Panse, I. Villa, J. C. Rousselle, R. Peronet, B. David, A. Namane, and S. M  cheri. 2001. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. *J. Immunol.* 166: 868–876.
32. Skokos, D., H. G. Botros, C. Demeure, J. Morin, R. Peronet, G. Birkenmeier, S. Boudaly, and S. M  cheri. 2003. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J. Immunol.* 170: 3037–3045.
33. Depinay, N., F. Hacini, W. Beghdadi, R. Peronet, and S. M  cheri. 2006. Mast cell-dependent down-regulation of antigen-specific immune response by mosquito bites. *J. Immunol.* 176: 4141–4146.
34. Radons, J., and G. Multhoff. 2005. Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exerc. Immunol. Rev.* 11: 17–33.
35. Laulagnier, K., H. Vincent-Schneider, S. Hamdi, C. Subra, D. Lankar, and M. Record. 2005. Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood Cells Mol. Dis.* 35: 116–121.
36. Winkler, B., C. Bolwig, U. Seppala, M. D. Spangfort, C. Ebner, and U. Wiedermann. 2003. Allergen-specific immunosuppression by mucosal treatment with recombinant Ves v 5, a major allergen of *Vespa vulgaris* venom, in a murine model of wasp venom allergy. *Immunology* 110: 376–385.
37. Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breittmayer, F. Cottrez, and H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18: 605–617.
38. Stock, P., O. Akbari, G. Berry, G. J. Freeman, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu. 2004. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat. Immunol.* 5: 1149–1156.
39. Hachem, P., M. Lisborne, M. L. Michel, S. Diem, S. Roongapinun, J. Lefort, G. Marchal, A. Herbelin, P. W. Askenase, M. Dy, and M. C. Leite-de-Moraes. 2005. α -Galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN- γ . *Eur. J. Immunol.* 35: 2793–2802.
40. Sawitzki, B., C. I. Kingsley, V. Oliveira, M. Karim, M. Herber, and K. J. Wood. 2005. IFN- γ production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J. Exp. Med.* 201: 1925–1935.
41. Myers, L., M. Croft, B. S. Kwon, R. S. Mittler, and A. Vella. 2005. Peptide-specific CD8 T regulatory cells use IFN- γ to elaborate TGF- β -based suppression. *J. Immunol.* 174: 7625–7632.
42. Th  ry, C., L. Duban, E. Segura, P. V  ron, O. Lantz, and S. Amigorena. 2002. Indirect activation of naive CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* 3: 1156–1162.
43. Vincent-Schneider, H., P. Stumptner-Cuvelette, D. Lankar, S. Pain, G. Raposo, P. Benaroch, and C. Bonnerot. 2002. Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *Int. Immunol.* 14: 713–722.
44. André, F., N. Chaput, N. E. C. Scharzt, C. Flament, N. Aubert, J. Bernard, F. Lemonnier, G. Raposo, B. Escudier, D. Hsu, et al. 2004. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J. Immunol.* 172: 2126–2136.
45. Marazuela, E. G., N. Prado, E. Moro, H. Fernández-García, M. Villalba, R. Rodríguez, and E. Batanero. 2008. Intranasal vaccination with poly(lactide-co-glycolide) microparticles containing a peptide T of Ole e 1 prevents mice against sensitization. *Clin. Exp. Allergy* 38: 520–528.
46. Delcayre, A., A. Estelles, J. Sperinde, T. Roulon, P. Paz, B. Aguilar, J. Villanueva, S. Khine, and J.-B. Le Pecq. 2005. Exosome display technology: applications to the development of new diagnostics and therapeutics. *Blood Cells Mol. Dis.* 35: 158–168.
47. Holt, P. G. 1994. A potential vaccine strategy for asthma and allied atopic diseases during early childhood. *Lancet* 344: 456–458.
48. Valenta, R. 2002. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 446–453.

ANEXO I. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE RATÓN TOLERANTE A Ole e 1

En condiciones normales, los antígenos solubles e inócuos que entran en contacto con la superficie de las mucosas -p. ej., vía nasal u oral- inducen un estado de “no respuesta” inmunológica, denominado tolerancia. Este estado se caracteriza porque el sistema inmune no responde frente a una nueva exposición a dicho antígeno. Sin embargo, en determinadas condiciones fisiopatológicas, como en las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, este estado de “no respuesta” se encuentra alterado [Akkoc *et al.*, 2011]. Así, una de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de las alergias está orientada a revertir la enfermedad mediante la inducción de tolerancia inmunológica frente a los alérgenos [Akdis & Akdis, 2011]. En este sentido, las vacunas mucosales, basadas en la inducción de tolerancia vía mucosas -en particular vía nasal- representan una alternativa segura y eficaz a la inmunoterapia convencional [Macaubas *et al.*, 2003; Wiedermann, 2005; Giudice & Campbell, 2006].

Numerosos estudios han observado que los exosomas pueden presentar propiedades inmunosupresoras tanto *in vitro* [Taylor *et al.*, 2006; Admyre *et al.*, 2007b], como *in vivo* [Karlsson *et al.*, 2001; Östman *et al.*, 2005; Péche *et al.*, 2006]. Esta respuesta viene determinada por su composición molecular que, a su vez, es un reflejo del tipo y del estado fisiopatológico de célula de la cual derivan [Chaput & Théry, 2011]. En base a esto, se ha propuesto el uso de exosomas con propiedades inmunosupresoras para el tratamiento de diversas patologías que resulten de una respuesta inmune exacerbada [Kim *et al.*, 2005b; Péche *et al.*, 2006].

Partiendo de estas premisas, nos planteamos la hipótesis de que una vacuna mucosal basada en la administración de exosomas con propiedades inmunosupresoras (tolerogénicas) podría representar un tratamiento eficaz para las enfermedades alérgicas. La necesidad de obtener exosomas con propiedades tolerogénicas nos llevó a establecer un modelo de ratón tolerante a Ole e 1.

Inducción de tolerancia

Para la inducción de tolerancia se administró el alérgeno (100 µg) en ausencia de adyuvante por vía i.n. durante tres días consecutivos. Este protocolo es similar - en lo referente a la ruta de administración, dosis del alérgeno y frecuencia de administración- al descrito para otros alérgenos como la ovoalbúmina -OVA, alérgeno del huevo- [Tsitoura *et al.*, 2000; Akbari *et al.*, 2001] y Bet v 1 -alérgeno principal del polen de abedul- [Wiedermann *et al.*, 2001]. Para analizar los parámetros asociados con la inducción de un estado de “no respuesta” se tomaron muestras de sangre y se extirparon los bazo y los pulmones. Como animales control se emplearon tanto ratones *naïve* como ratones sensibilizados a Ole e 1 (ratones alérgicos).

Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 sobre los niveles de anticuerpos específicos en suero

Los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos en suero fueron determinados mediante ELISA (**Figura 19**). La administración de dosis elevadas de Ole e 1 vía i.n. no originó un aumento en los niveles anticuerpos IgE específicos en el suero, ya que éstos eran equivalentes a los obtenidos en los ratones *naïve*. Sin embargo, los ratones alérgicos mostraron elevados niveles de anticuerpos IgE específicos en suero, característicos del estado alérgico [Marazuela *et al.*, 2008b].

De igual forma, la administración por vía i.n. de dosis elevadas de Ole e 1 tampoco indujo la síntesis de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos en los ratones tolerantes. En cambio, los ratones alérgicos mostraron unos niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos elevados, tal y como se ha descrito para este protocolo de inmunización [Marazuela *et al.*, 2008b].

Estos resultados indicaron que la administración vía i.n. de elevadas dosis de Ole e 1, en ausencia de adyuvante, no provoca la síntesis de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos en el suero.

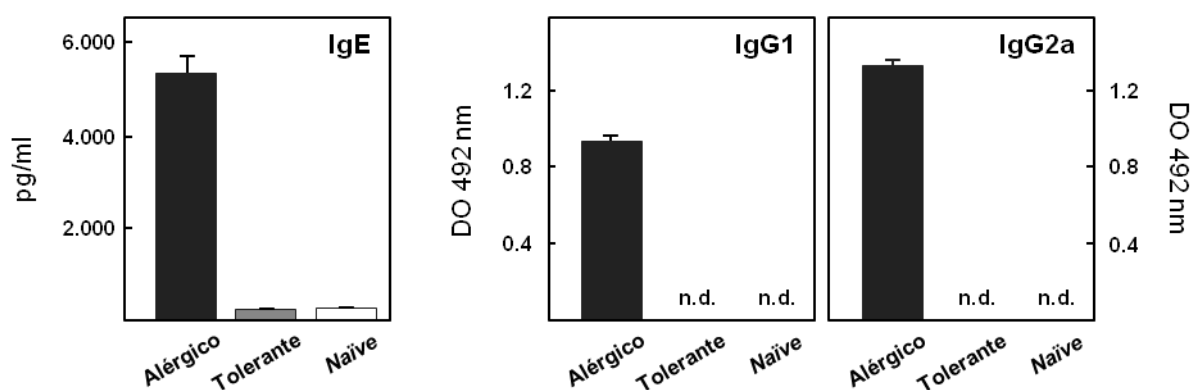


Figura 19. Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 en los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos presentes en el suero. Los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos fueron determinados mediante ELISA. En el estudio se establecieron 3 grupos: **Alérgico**, ratones sensibilizados a Ole e 1; **Tolerante**, ratones tratados vía i.n. con Ole e 1; y **Naïve**, ratones no tratados. Los datos corresponden a la media \pm SEM ($n=4$ /grupo). n.d., no detectado.

Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 sobre la respuesta de las células T específicas

Con el fin de determinar el efecto del tratamiento vía i.n. con elevadas dosis de Ole e 1 sobre las células T específicas de bazo, se analizó la respuesta linfoproliferativa de éstas, tras ser estimuladas *in vitro* con el alérgeno (**Figura 20**). El índice de estimulación de los cultivos de esplenocitos procedentes de los ratones tratados vía i.n. con Ole e 1 fue significativamente menor (57.5%) que el obtenido para los ratones alérgicos. Este resultado pone de manifiesto que la administración vía i.n. de Ole e 1 inhibe la respuesta de las células T *in vitro*. Resultado que es consistente con el obtenido en otros estudios en los que también se demostró que la inducción de la tolerancia inhibe la proliferación celular [Kennedy *et al.*, 1997].

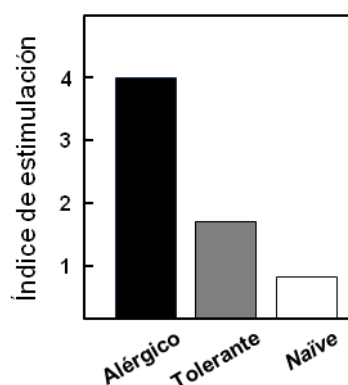


Figura 20. Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 sobre la proliferación de las células T específicas de bazo. La respuesta proliferativa de las células T específicas, expresada como índice de estimulación, fue determinada mediante la incorporación de timidina- H^3 al DNA en los cultivos de esplenocitos. **Alérgico**, ratones sensibilizados a Ole e 1; **Tolerante**, ratones tratados vía i.n. con Ole e 1; y **Naïve**, ratones no tratados. Los datos corresponden a la media ($n=4$ /grupo).

Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 en las vías aéreas inferiores

Los pulmones se extirparon 24 h después de la última administración i.n. de Ole e 1, para analizar la respuesta inflamatoria tras su tinción con H&E y PAS (**Figura 21**).

El análisis de los cortes histológicos reveló que la administración de elevadas dosis del alérgeno vía i.n. no alteraba la histología del pulmón como resultado de una respuesta inflamatoria, puesto que ésta era equivalente a la de los ratones *naïve*. En contraste, el examen histológico de los animales alérgicos mostró una gran infiltración de células inflamatorias -linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas-, así como zonas de hiperplasia de las células epiteliales y caliciformes.

En resumen, la administración de elevadas dosis de Ole e 1 vía i.n. no induce una respuesta inflamatoria a nivel de las vías aéreas inferiores.

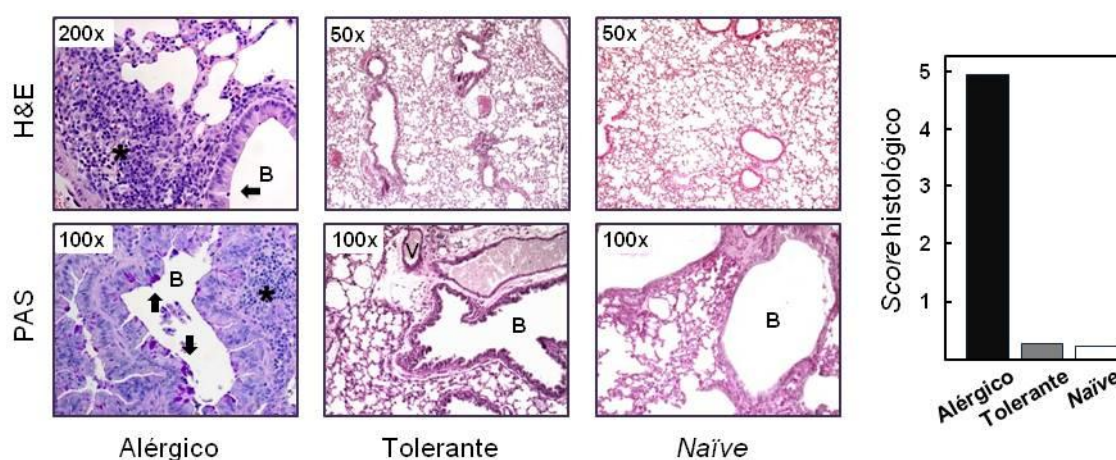


Figura 21. Efecto del tratamiento i.n. con Ole e 1 en la respuesta inflamatoria de las vías aéreas inferiores. Micrografías de secciones de pulmón teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) y ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). **Alérgico**, ratones sensibilizados a Ole e 1; **Tolerante**, ratones tratados vía i.n. con Ole e 1; y **Naïve**, ratones no tratados. Los datos corresponden a la media de la respuesta inflamatoria total ($n=2$ /grupo). Los asteriscos muestran las zonas de infiltración celular y las flechas, zonas de hiperplasia de las células epiteliales y caliciformes. B, bronquio; V, vaso sanguíneo.

Los resultados obtenidos demuestran que la administración vía i.n. de altas dosis de Ole e 1, sin adyuvante, inducen un estado de “no respuesta” frente a dicho alérgeno, como indican: (I) la ausencia de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos en el suero, (II) la inhibición de la respuesta linfoproliferativa y (III) la carencia de una respuesta inflamatoria en las vías aéreas inferiores. Este modelo de ratón tolerante a Ole e 1 será empleado en los estudios subsiguientes como fuente de Exo_{Tol}, los cuales se administrarán como vacuna i.n. en un modelo de ratón alérgico.

Las bases celulares y moleculares que subyacen al fenómeno de tolerancia inmunológica no se conocen con exactitud, aunque se han implicado 3 mecanismos: (I) inducción de anergia [Melamed & Friedman, 1993; Friedman & Weiner, 1994; van Houten & Blake, 1996], (II) delección clonal de células T específicas [Chen *et al.*, 1995] e (III) inmunoregulación mediada por células Treg [McMenamin & Holt, 1993; Chen *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2001; Akbari *et al.*, 2002; Ostroukhova *et al.*, 2004]. Los mecanismos de inducción de tolerancia son muy complejos y dependen de muchos factores, tales como

la naturaleza del antígeno, la dosis, frecuencia y ruta de administración, el empleo de adyuvantes, el tipo de APC presente en el sitio de entrada del antígeno, la edad y la genética del animal [Chen *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1998; Weiner, 2000].

Los protocolos de sensibilización clásicos implican la administración sistémica del alérgeno en presencia de adyuvantes, tales como $\text{Al}(\text{OH})_3$, que promueven una respuesta Th2 tras la exposición al alérgeno. En ratón, esta respuesta se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgE e IgG1 específicos en suero, asociada a la producción de citoquinas Th2. En el caso de antígenos administrados en mucosas, en algunas ocasiones se requiere del uso de adyuvantes mucosales para inducir la respuesta inmune adecuada. Entre ellos destaca la enterotoxina de *Vibrio cholerae* o toxina del cólera (CTB), que es uno de los adyuvantes más potentes [Eriksson & Holmgren, 2002; Holmgren *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2010]. Sin embargo, el tipo de respuesta inducida por este adyuvante es altamente dependiente de la naturaleza del alérgeno. Así, se ha demostrado que la administración i.n. de OVA-CTB suprime los parámetros relacionados con la reacción alérgica en un modelo de ratón, mientras que Bet v 1-CTB los exacerba [Wiedermann *et al.*, 1998; Wiedermann *et al.*, 1999b]. En general, la administración del alérgeno sin adyuvante vía mucosas -p. ej., vía gastrointestinal, urogenital o respiratoria- induce un estado de tolerancia inmunológica [Lowrey *et al.*, 1998; Strobel & Mowat, 1998; van Parijs *et al.*, 1998]. La administración de OVA en forma de aerosol induce un estado de tolerancia sistémica, caracterizado por la inhibición de la síntesis de IgE específicas, en modelos murinos [Holt *et al.*, 1981; McMenamin *et al.*, 1994; Seymour *et al.*, 1998]. Así mismo, la administración vía i.n. de alérgenos como OVA o Bet v 1 genera un estado de tolerancia mucosal [Tsitoura *et al.*, 2000; Wiedermann *et al.*, 2001; Akbari *et al.*, 2001]. También en este caso el tipo de respuesta inmune viene determinada por la naturaleza del alérgeno. Esta capacidad es debida las propiedades intrínsecas de los alérgenos individuales, tales como su estructura terciaria, las modificaciones post-traduccionales [Petersen *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 1998] y, tal vez, su actividad biológica [Bufe *et al.*, 1995; Petersen *et al.*, 1999; Grobe *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999]. La administración i.n. de Bet v 1 antes de la sensibilización suprime la respuesta alérgica tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que OVA administrada en idénticas condiciones es menos tolerogénica que el alérgeno del polen [Wiedermann *et al.*, 1998; Wiedermann *et al.*, 1999a]. Por el contrario, exposiciones repetidas a extractos alergénicos complejos, tales como el del ácaro del polvo doméstico, provoca una inflamación persistente y remodelación de las vías aéreas [Takahashi *et al.*, 2010]. Esto es debido a que determinados alérgenos presentes en este extracto exhiben actividad proteasa, como Der p 1, lo que resulta en un incremento de la permeabilidad del epitelio bronquial [Wan *et al.*, 1999] o presentan propiedades adyuvantes, como Der p 2, activando las células del sistema inmune innato y adaptativo [Osterlund *et al.*, 2009].

La dosis y la frecuencia de administración del antígeno también son factores determinantes: elevadas dosis de antígeno en etapas tempranas, incluso una única dosis, puede producir anergia y/o delección clonal en linfocitos [Chen *et al.*, 1995; Melamed *et al.*, 1996; Marth *et al.*, 1998; Taams *et al.*, 1999; Weiner, 2001; Burks *et al.*, 2008]. Por el contrario, bajas dosis, especialmente repetidas, favorecen la inducción de células Treg, describiéndose varios subtipos en base al patrón de IL-10 y TGF- β [Read & Powrie, 2001; Weiner, 2001; Battaglia *et al.*, 2002; Burks *et al.*, 2008].

En 1.983 se observó por primera vez que el procesamiento de antígenos en el intestino induce un factor tolerogénico en circulación, no relacionada directamente con la cantidad de antígeno en sangre

[Strobel *et al.*, 1983]. Posteriormente estas observaciones fueron confirmadas por otros estudios [Bruce & Ferguson, 1986; Bruce *et al.*, 1987; Peng *et al.*, 1989; Peng *et al.*, 1990; Furrie *et al.*, 1994; Furrie *et al.*, 1995]. Más tarde, Karlsson *et al.* [2001] demostraron que este factor sérico correspondía a exosomas secretados por células epiteliales intestinales, a los que denominaron tolerosomas, que contenían complejos MHC-II/péptido, ya que la eliminación de éstos del suero no inducía tolerancia en animales receptores. La inducción de tolerancia vía mucosas no sólo se restringe al suero, sino que se extiende a otros tejidos como el bazo y el pulmón, y un pequeño porcentaje de las células tolerogénicas persisten en la periferia [Pape *et al.*, 1998]. Además, se ha demostrado que mediante la transferencia de estas células a animales *naïve* se induce un estado de tolerancia y, por lo tanto, se protege frente a la subsiguiente sensibilización al alérgeno [Ostroukhova *et al.*, 2004; Karlsson *et al.*, 2010]. Estas propiedades especiales del estado de tolerancia nos han llevado a proponer que los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes podrían mantener el fenotipo tolerogénico de las células de origen. Así, la administración de estos exosomas a animales *naïve*, antes de la sensibilización alérgica, prevendría el desarrollo de la enfermedad.

ANEXO II. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE EXOSOMAS CONTROL EN LA SENSIBILIZACIÓN ALÉRGICA

En la presente tesis, el objetivo general del primer bloque se centró en estudiar el potencial uso de Exo_{Tol}, derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, como vacuna nasal para la alergia. Sin embargo, este estudio requiere el uso de un grupo de animales control. Dado que la respuesta inmune provocada por los exosomas viene determinada por el estado de la célula de la que derivan [Karlsson *et al.*, 2001; Östman *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005b; Péche *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2006; Admyre *et al.*, 2007b; Chaput & Théry, 2011], es comprensible pensar que la administración de exosomas derivados de animales *naïve* no afecte a la sensibilización alérgica. Con el fin de verificar esta hipótesis y poder establecer un grupo de animales control, los ratones fueron tratados por vía i.n. con Exo_{Con}, aislados del BALF de ratones *naïve*, antes de la sensibilización a Ole e 1. La respuesta inmune se analizó atendiendo a los parámetros asociados con la reacción alérgica, en comparación con ratones sensibilizados a Ole e 1, según el modelo descrito por Marazuela *et al.* [2008b].

Efecto de la administración i.n. de Exo_{Con} sobre los niveles de anticuerpos específicos en suero

Los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos en sueros fueron determinados mediante ELISA (**Figura 22**). La administración vía i.n. de Exo_{Con} antes de la sensibilización a Ole e 1 no modificó significativamente los niveles de anticuerpos IgE e IgG1 específicos en suero, en comparación con los animales alérgicos. Sin embargo, como consecuencia de la administración de Exo_{Con} los niveles de anticuerpos IgG2a específicos en el suero fueron inferiores (76%) a los obtenidos en el grupo alérgico. En ratón, los isotipos IgE e IgG1 se correlacionan con un perfil inmunológico de tipo Th2, mientras que el isotipo IgG2a con un perfil Th1 [Mosmann & Coffman, 1989; Mountford *et al.*, 1994].

Estos resultados demostraron que la administración de Exo_{Con} antes de la sensibilización a Ole e 1 no afecta a la síntesis de anticuerpos IgE e IgG1 específicos, isotipos que caracterizan la respuesta Th2 en ratón [Marazuela *et al.*, 2008b].

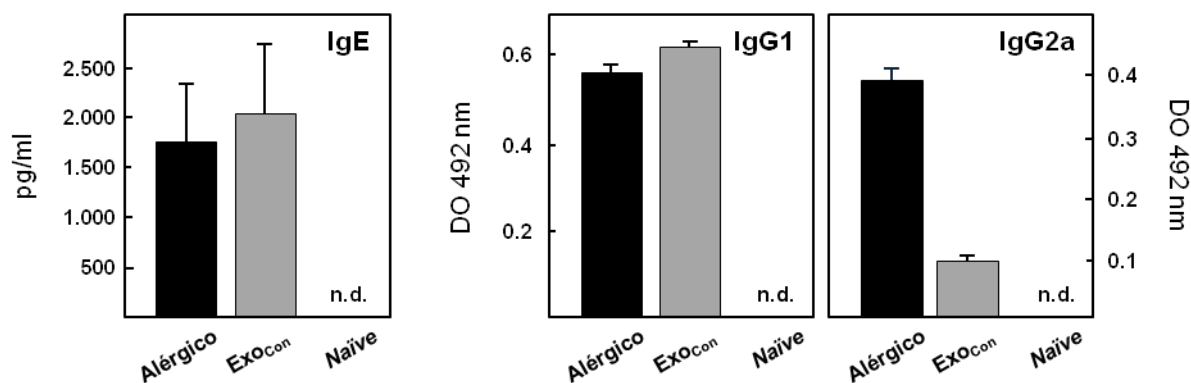


Figura 22. Efecto de la administración i.n. de Exo_{Con} en los niveles séricos de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos. Los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos fueron determinados mediante ELISA. Exo_{Con}, ratones pretratados con Exo_{Con} antes de la sensibilización a Ole e 1; **Alérgico**, ratones sensibilizados a Ole e 1; y **Naïve**, ratones no tratados. Los valores corresponden a la media ($n=2/\text{grupo}$) \pm SEM. n.d., no detectado.

Efecto de la administración i.n. de Exo_{Con} en la respuesta de las células T específicas

Con el fin de determinar si la administración vía i.n. de Exo_{Con} antes de la sensibilización afecta a la respuesta de las células T específicas de bazo, se evaluaron la respuesta linfoproliferativa y los niveles de citoquinas presentes en el sobrenadante de los cultivos, tras estimularlos con Ole e 1 *in vitro* (Figura 23).

Los índices de estimulación de los cultivos de esplenocitos de los ratones que recibieron Exo_{Con} antes de la sensibilización a Ole e 1 fueron similares a los obtenidos para los ratones alérgicos (Figura 23A). Este resultado demostró que la respuesta linfoproliferativa asociada a la sensibilización a Ole e 1 no se alteraba como consecuencia de la administración de Exo_{Con}.

Considerando los niveles de citoquinas, la administración de Exo_{Con} incrementó los niveles de IL-5 (citoquina de tipo Th2) e IFN- γ (citoquina de tipo Th1) en un 44% y un 47%, respectivamente, en comparación con los animales alérgicos (Figura 23B). El incremento en los niveles de IFN- γ podría ser debido a la naturaleza lipídica de los exosomas, ya que diversos estudios han demostrado que determinados lípidos pueden actuar como adyuvantes y favorecer el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 [Puggioni *et al.*, 2005; Muindi *et al.*, 2010]. Los niveles de IL-10 no se vieron modificados significativamente al comparar el grupo de animales a los que se les administró Exo_{Con}, con respecto a los alérgicos. Además, en estos cultivos no se detectó IL-4, lo que podría deberse al rápido consumo de esta citoquina por las células [Howard *et al.*, 1982].

Estos resultados indican que la administración i.n. de Exo_{Con} antes de la sensibilización con el alérgeno no afecta significativamente a la respuesta de las células Th2 específicas de Ole e 1, uno de los parámetros clave que caracterizan la reacción alérgica [Marazuela *et al.*, 2008b].

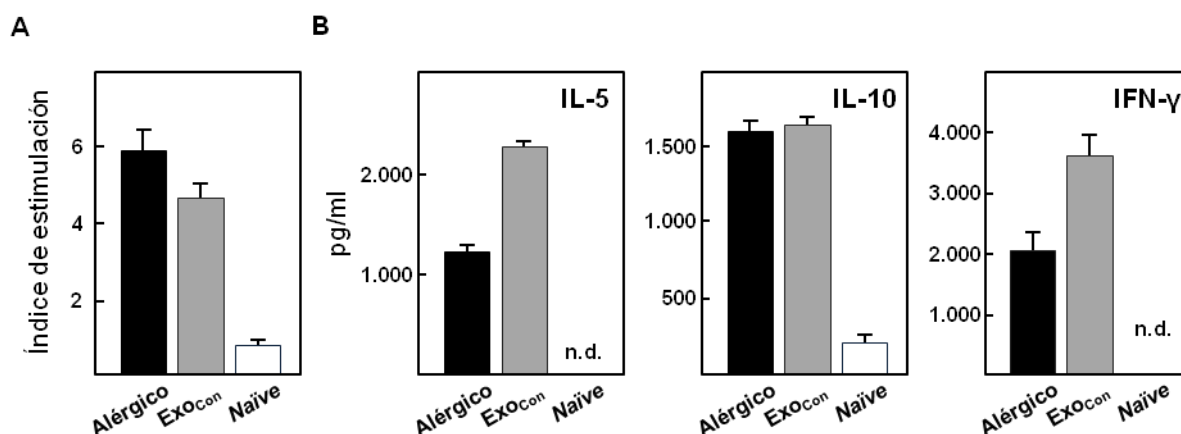


Figura 23. Efecto de la administración i.n. de Exo_{Con} en la respuesta de las células T específicas de bazo. (A) Proliferación celular, determinada mediante la incorporación de timidina- H^3 al DNA en los cultivos de esplenocitos a las 96 h. Los datos se expresaron como índice de estimulación. (B) Niveles de IL-5, IL-10 e IFN- γ , determinados mediante ELISA en sándwich, en el medio de cultivo después de 48 ó 72 h. **Exo_{Con}**, ratones pretratados con exosomas control antes de la sensibilización a Ole e 1; **Alérgico**, ratones sensibilizados a Ole e 1; y **Naïve**, ratones no tratados. Los datos corresponden a la media ($n=2$ /grupo) \pm SEM. n.d., no detectado.

Efecto de la administración i.n. de Exo_{Con} en la inflamación de las vías aéreas inferiores

Los pulmones se extirparon 24 h después de la última administración vía i.n. de Ole e 1 para analizar la respuesta inflamatoria tras su tinción con H&E o PAS (**Figura 24**). El análisis de los cortes histológicos de los pulmones de los ratones tratados con Exo_{Con}, al igual que el de los alérgicos, mostró una gran infiltración celular caracterizada por la presencia de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas. Las micrografías teñidas con PAS revelaron la presencia de tapones de moco intrabronquiales tanto en el grupo de animales tratados con Exo_{Con} como en los alérgicos. Además, la administración de Exo_{Con} antes de la sensibilización a Ole e 1 no modificó significativamente los parámetros histológicos de los pulmones, en comparación con los ratones alérgicos. Estos resultados demostraron que la infiltración celular, la morfología y el estado del tejido de los ratones a los que se les administró Exo_{Con} eran equiparables a los ratones sensibilizados a Ole e 1, según el protocolo clásico descrito por Marazuela *et al.* [2008b].

La administración i.n. de Exo_{Con}, antes de la sensibilización a Ole e 1, no afecta al desarrollo de la respuesta inflamatoria local en el pulmón, característica del modelo de ratón alérgico a Ole e 1.

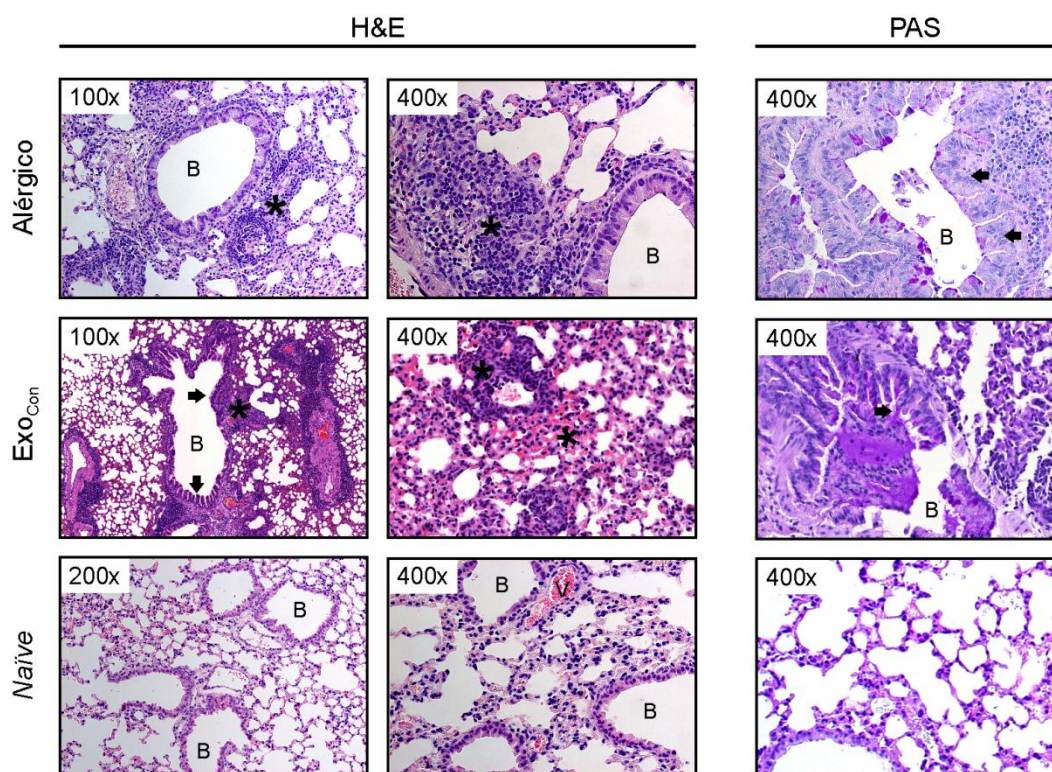


Figura 24. Efecto de la administración i.n. de Exo_{Con} en la respuesta inflamatoria de las vías aéreas inferiores. Micrografías de secciones de pulmón teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) y ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). **Alérgico**, ratones sensibilizados a Ole e 1; **Exo_{Con}**, ratones pretratados con Exo_{Con} antes de la sensibilización al alérgeno; y **Naïve**, ratones no tratados. Los asteriscos muestran las zonas de infiltración celular y las flechas, zonas de hiperplasia de las células epiteliales y caliciformes. B, bronquio; V, vaso sanguíneo.

El análisis conjunto de los datos confirma que la administración vía i.n. de Exo_{Con} antes de la inmunización a Ole e 1 no afecta al desarrollo de la respuesta alérgica, tal y como demuestran los

niveles de anticuerpos IgE e IgG1 específicos presentes en el suero, la respuesta de las células Th2 específicas y la respuesta inflamatoria en pulmón. El estado alérgico desarrollado en los animales tratados con Exo_{Con} antes de la inmunización era comparable al que se observa en el protocolo clásico de sensibilización descrito por Marazuela *et al.* [2008b]. Además, los datos obtenidos en la presente tesis coinciden con diversos estudios en los que se ha demostrado que la administración de exosomas derivados de ratones *naïve* no modifica la inducción de una respuesta inmune [Karlsson *et al.*, 2001; Almqvist *et al.*, 2008; Qazi *et al.*, 2009]. Karlsson *et al.* [2001] observaron que los tolerosomas aislados del suero de ratas tratadas con OVA presentaban propiedades inmunosupresoras, pero no los aislados del suero de ratas no tratadas. Así mismo, los tolerosomas de ratones tratados por vía oral con OVA son capaces de prevenir la sensibilización a OVA en un modelo de ratón, pero no los derivados de animales *naïve* [Almqvist *et al.*, 2008].

Los animales pretratados con Exo_{Con} se utilizarán como grupo control en los estudios profilácticos para la alergia, basados en la administración de exosomas aislados de ratones tolerantes a Ole e 1 (Exo_{Tol}).

ARTÍCULO II. SUPRESIÓN ACTIVA DE LA SENSIBILIZACIÓN A UN ALÉRGENO NO RELACIONADO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE EXOSOMAS TOLEROGÉNICOS EN RATÓN

Noela Prado, Marta Cañamero, Mayte Villalba, Rosalía Rodríguez y Eva Batanero.

Los exosomas representan una nueva familia de nanovesículas bioactivas (30-100 nm de diámetro) secretadas por diferentes tipos celulares, cuyas propiedades inmunológicas se pueden utilizar para el diseño de vacunas frente a distintas enfermedades humanas. En estudios previos, empleando un modelo de ratón sensibilizado a Ole e 1 -alérgeno principal del polen de olivo-, sugerimos la posibilidad de utilizar exosomas tolerogénicos (Exo_{Tol}) derivados del fluido broncoalveolar (BALF) como vacuna nasal para la alergia. El objetivo del presente estudio fue investigar si dichas nanovesículas específicas para Ole e 1 podrían también prevenir la sensibilización frente a otro alérgeno no relacionado como Bet v 1, alérgeno principal del polen de abedul. Los Exo_{Tol} fueron aislados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1 y se emplearon en un protocolo profiláctico. Los ratones BALB/c fueron pretratados intranasalmente con Exo_{Tol}, una semana antes de la sensibilización/provocación a Bet v 1, y se analizó la respuesta inmune desarrollada frente al alérgeno. El pretratamiento con Exo_{Tol} inhibió significativamente los niveles de los anticuerpos IgE e IgG1 específicos. Además, las células T de los ratones pretratados con Exo_{Tol} presentaron una reducción en la producción de IL-5 e IL-13 (citoquinas Th2). La respuesta inflamatoria pulmonar provocada por la reexposición al alérgeno no relacionado, se vio reducida significativamente tras el pretratamiento: la infiltración de células inflamatorias a nivel perivascular/peribronquial, la eosinofilia y la secreción de moco. En conclusión, los Exo_{Tol} específicos de Ole e 1, además de inhibir la respuesta inmune específica de este alérgeno, bloquearon la respuesta alérgica a un segundo alérgeno no relacionado, Bet v 1. La supresión activa *in vivo* que aquí se describe para los Exo_{Tol} podría tener implicaciones para el tratamiento de la alergia basadas en la inducción de tolerancia mucosal.

Molecular Immunology (2010) **47**:2148-2151.



Short communication

Bystander suppression to unrelated allergen sensitization through intranasal administration of tolerogenic exosomes in mouse

Noela Prado^a, Marta Cañamero^b, Mayte Villalba^a, Rosalía Rodríguez^a, Eva Batanero^{a,*}^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain^b Comparative Pathology Unit, Biotechnology Programme, CNIO, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2010

Received in revised form 19 April 2010

Accepted 22 April 2010

Available online 15 May 2010

Keywords:

Bystander suppression

Exosomes

Intranasal vaccine

Pollen

Ole e 1

Bet v 1

ABSTRACT

Exosomes represent a new family of bioactive nanovesicles (30–100 nm in diameter) secreted by different cell types whose appealing features can be exploited for designing vaccines in the context of several human diseases. We previously reported the potential of bronchoalveolar lavage fluid (BALF)-derived tolerogenic exosomes (Exo_{Tol}) to be used as a nasal allergy vaccine in a mouse model of sensitization to Ole e 1, the main allergen of olive pollen. The aim of the study was to investigate whether such nanovesicles specific to Ole e 1 can also prevent the sensitization to other unrelated allergen, as Bet v 1 from birch pollen. Exo_{Tol} were isolated from BALF of mice tolerized against Ole e 1 and used in a prophylactic approach. BALB/c mice were intranasally pretreated with Exo_{Tol} one week before sensitization/challenge with Bet v 1, and the magnitude of allergen-specific response was analyzed. Intranasal pretreatment with Exo_{Tol} resulted in significant inhibition of both specific IgE and IgG1 antibodies levels. Moreover, T cells from mice pretreated with Exo_{Tol} showed a reduction in IL-5 and IL-13 (Th2 cytokines) production. Lung inflammatory response triggered by unrelated allergen-challenge was also significantly reduced after pretreatment: perivascular/peribronchial inflammatory cell infiltration, eosinophilia and mucus secretion. In conclusion, Exo_{Tol} specific to Ole e 1, in addition to inhibit specific immune response to this allergen, blocked the allergic response to a second unrelated allergen such as Bet v 1. The in vivo “bystander suppression” that we herein describe for Exo_{Tol} may have implications for the treatment of allergy based on mucosal tolerance induction.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tree pollens are among the most important allergen sources (D'Amato et al., 1998). While olive pollen is one of the commonest causes of pollinosis in Mediterranean countries, birch pollen has been reported predominantly in northern and central Europe. The most clinically relevant allergens from these two sources, Ole e 1 (olive pollen) and Bet v 1 (birch pollen), have been described as diagnosis markers for sensitization to *Oleaceae* and *Fagales* pollens, respectively (Mothes et al., 2004). Bet v 1 has also been related to plant food allergies (Mothes et al., 2004). Therefore, both molecules have been considered as model allergens for the study of allergic diseases and for the design of novel strategies for their treatments.

Exosomes represent a new family of bioactive nanovesicles (30–100 nm in diameter) which are released into the extracellular

Abbreviations: Ab, antibody; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; Exo_{Tol}, tolerogenic exosomes; Exo_{Con}, exosomes from naïve animals; i.n., intranasal; i.p., intraperitoneal; OD, optical density.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3944155; fax: +34 91 3944159.

E-mail address: ameva@bbm1.ucm.es (E. Batanero).

medium after the fusion of multivesicular bodies of the endosomal system with the plasma membrane, allowing the intercellular transfer of membrane components, proteins and nucleic acids (Simons and Raposo, 2009; Simpson et al., 2009; Théry et al., 2009). Secretion of exosomes has been described for different animal cell types including immune cells (Simons and Raposo, 2009; Simpson et al., 2009; Théry et al., 2009). In addition, they have been isolated from several body fluids like serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), urine, tumoral effusions, sperm, breast milk and saliva (Simpson et al., 2009; Théry et al., 2009). Although their biological function is not completely understood, the use of natural or engineered exosomes to modulate immune system has been proposed as a promising approach for the treatment of clinical disorders (Delcayre et al., 2005; Simpson et al., 2009). Exosomes have already been successfully assayed in several phase I clinical trials for the treatment of patients with cancer. In addition, exosomes have also proved useful, in animal models, in treatment of autoimmune diseases, infections and transplantations. Regarding allergic diseases, we previously reported the potential of BALF-derived tolerogenic exosomes (Exo_{Tol}) to be used as an allergy vaccine (Prado et al., 2008). We isolated exosomes from BALF of mice tolerized to main allergen of olive pollen Ole e 1, and demonstrated that intranasal

(i.n.) administration of these Exo_{Tol} to mice prevented sensitization to this allergen. The aim of this study was to investigate whether such vesicles specific for Ole e 1 can also prevent the sensitization to a second unrelated allergen such as the major allergen from birch pollen Bet v 1, a phenomenon called “bystander suppression”.

2. Materials and methods

2.1. Allergens

Ole e 1 allergen was purified from olive (*Olea europaea*) pollen as described (Villalba et al., 1993). Purified birch (*Betula verrucosa*) pollen allergen Bet v 1 was kindly provided by Dr. R.I. Monsalve (ALK-Abelló, Madrid, Spain).

2.2. Mice

Female BALB/c mice (6–8-week-old) were obtained from Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona, Spain). Experiments were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the Complutense University (Madrid, Spain).

2.3. Induction of tolerance, collection of BALF and exosomes purification

Mice received i.n. 100 µg of Ole e 1, in a volume of 20 µL PBS, on 3 consecutive days under anesthesia (Prado et al., 2008).

Exo_{Tol} were isolated from BALF of tolerized mice 24 h after last i.n. challenge with Ole e 1 as described in detail previously

(Prado et al., 2008). Exosomes were purified by filtration on 0.22 µm pore syringe filters, followed by ultracentrifugation at 100,000 × g for 1 h, and the resulting pellet was washed in PBS. The protein concentration in exosome preparations was measured by the micro-bicinchoninic acid assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Exosomes were also prepared from BALF of naïve mice (Exo_{Con}) as control. These exosomes display the typical markers and morphology as in our previous published work (Prado et al., 2008), as evaluated by western blotting, flow cytometry and electron microscopy.

2.4. Bystander tolerance

Anesthetized mice were i.n. pretreated with 5 µg of Exo_{Tol} divided on 3 doses for 3 consecutive days (Fig. 1A) (Prado et al., 2008). One week thereafter, animals were sensitized intraperitoneally (i.p.) with 1 µg of Bet v 1 in 2 mg of alum (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), in a volume of 150 µL PBS, on days 9 and 16. After 7 days, mice were i.n. challenged with 10 µg of Bet v 1 in 20 µL PBS on 3 consecutive days under anesthesia and the magnitude of allergen-specific response was analyzed. Exo_{Con} were used as Exo_{Con}-pretreated controls. The experiments were performed with 7 mice per group and repeated 2 times to ensure reproducibility.

2.5. Determination of specific-allergen IgG1, IgG2a and total IgE in serum

Blood samples were collected 7 days after the last immunization (terminal bleeding). Individual sera were prepared and stored at –20 °C until used. Bet v 1-specific antibodies (Ab) were measured

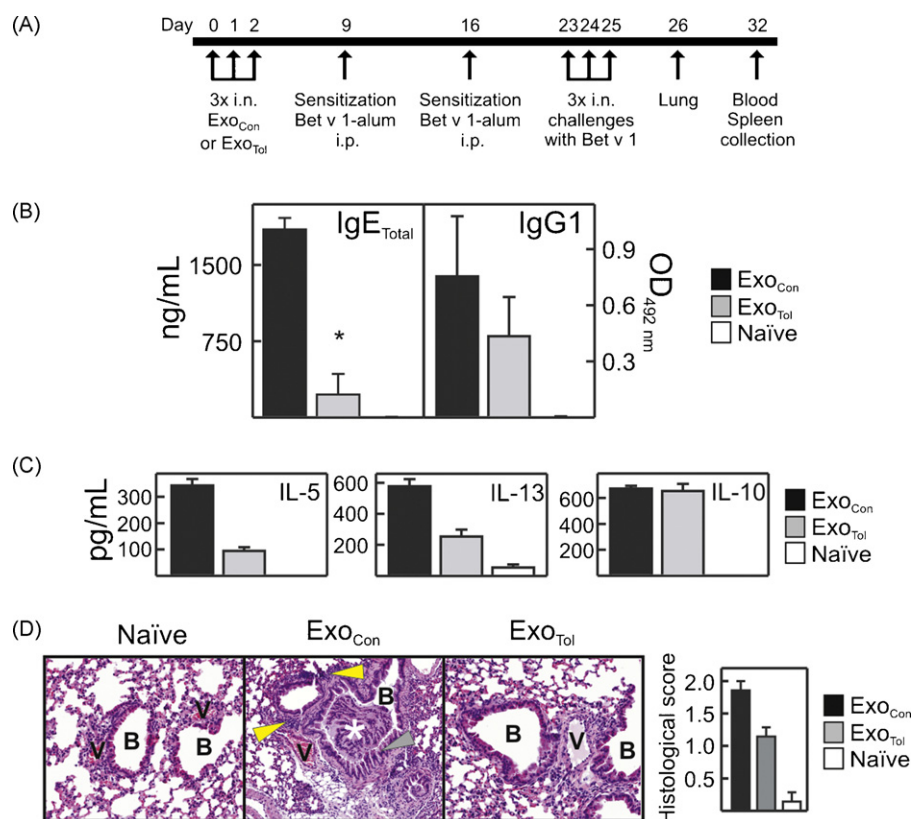


Fig. 1. Exo_{Tol} pretreatment induces bystander protection against Bet v 1-sensitization. (A) Experimental design. (B) Serum levels of total IgE and specific IgG1 determined by ELISA. Data are expressed as mean ± s.e.m. (n = 5 mice/group). Significant differences of Exo_{Con}-pretreated versus Exo_{Tol}-pretreated group were determined using Student's *t*-test. **P* < 0.03 compared with Exo_{Con}-pretreated mice. (C) Cytokine production in spleen cell cultures stimulated *in vitro* with Bet v 1 (2 µg/mL). The values represent cytokine concentration after subtraction of the baseline values. Results are shown as mean ± S.E.M. (n = 5 mice/group). (D) Representative histopathological areas of lung sections from each group (n = 2 mice/group). Lung sections were stained with haematoxylin and eosin. Magnifications, ×200. Yellow arrow, area with inflammatory infiltration. Grey arrow, hyperplastic bronchiolar epithelium; White star, mucous plug. B, bronchium; V, blood vessel. Data are representative of 2 independent experiments.

by ELISA (Prado et al., 2008). Briefly, microtiter plates were coated with Bet v 1 (1 µg/mL) in PBS, pH 7.2, overnight at 4 °C. Serum samples were diluted: 1:40 for IgE, 1:500 for IgG1, 1:100 for IgG2 antibodies measurement. Bound mouse immunoglobulins were detected using either peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG1 (1:5000) or IgG2a (1:5000) antibodies (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) and ortho-phenylenediamine chloride as substrate. Optical density (OD) was measured at 492 nm.

Total IgE Ab was measured in serum samples (1:40) by a sandwich ELISA using the OptEIA mouse IgE set (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. In our mouse model it has been shown that specific IgE can be estimated by measuring total IgE level in serum (Batanero et al., 2002).

2.6. Cytokine assays

To measure cytokine production, spleen cells were cultured in 48-well plates at 10^7 cells/mL (0.5 mL/well) and stimulated with Bet v 1 (2 µg/mL) (Prado et al., 2008). Supernatants were taken after 48 or 72 h and stored at –20 °C until analysis. Levels of IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 and IFN-γ were measured by ELISA sandwich (BD Pharmingen). A set was used for analysis of IL-13 (Bioscience Inc., San Diego, CA, USA). Values in pg/mL were calculated according to standard curves obtained with recombinant mouse cytokines. The sensitivity of the assays was 5 pg/mL for IL-4, 15 pg/mL for IL-5, 15 pg/mL for IL-10, 30 pg/mL for IL-13 and 25 pg/mL for IFN-γ.

2.7. Lung histology

For histopathological analysis 2–4 µm paraffin sections were stained with haematoxylin and eosin. For each mouse, ten airway sections randomly distributed through the lung were assessed for severity of inflammatory response by morphometric analysis, by individuals blinded to the protocol design (Prado et al., 2008).

3. Results

To analyze whether Exo_{Tol} specific to Ole e 1 allergen from olive pollen were able to inhibit sensitization with an unrelated allergen as Bet v 1 from birch pollen, Exo_{Tol} were isolated from BALF of mice tolerized to Ole e 1 and used in a prophylactic approach in a mouse model of Bet v 1 sensitization (Fig. 1A).

3.1. Exo_{Tol} inhibit both specific IgE and IgG1 Ab to the unrelated allergen Bet v 1

Intranasal pretreatment of mice with Exo_{Tol} resulted in significant inhibition of total IgE Ab levels as compared to the Exo_{Con}-pretreated animals (control group) (Fig. 1B). Also specific-IgG1 Ab levels decreased. By contrast, specific-IgG2a Ab levels were not detected in any of the experimental groups.

3.2. Intranasal pretreatment with Exo_{Tol} inhibits Th2 cytokines

Exo_{Tol}-pretreated mice showed significantly reduced IL-5 and IL-13 levels induced by Bet v 1 stimulation in comparison to the Exo_{Con}-pretreated controls (Fig. 1C). IFN-γ and IL-4 levels, in turn, were barely detected in any of the animals. No changes were observed in IL-10 levels as consequence of Exo_{Tol}-pretreatment.

3.3. Intranasal pretreatment with Exo_{Tol} reduce allergen-induced airway inflammation

Histopathological examination of lung sections revealed that pretreatment with Exo_{Tol} significantly reduced lung inflammatory response triggered by unrelated allergen-challenge by

blocking peribronchial/perivascular inflammatory cell infiltration, eosinophilia and mucus secretion compared with Exo_{Con}-pretreated controls (Fig. 1D).

4. Discussion

Prophylactic experiments settings have proven to be successful in hindering the development of type I allergy. We have previously shown in a mouse model of Ole e 1 sensitization that i.n. pretreatment with Exo_{Tol} specific to Ole e 1 led to a significant suppression of allergen-specific response (Prado et al., 2008). Similarly, in the present study i.n. pretreatment with Exo_{Tol} specific to Ole e 1, but not with exosomes from naïve animals (Exo_{Con}), proved to be successful in preventing sensitization to the unrelated allergen Bet v 1, as indicated by a significant reduction in three important immunological parameters that characterized allergic response in humans: serum specific-IgE Ab levels, Th2-cytokines (IL-5 and IL-13) and airway inflammation. This inhibitory phenomenon, known as “bystander suppression” (Miller et al., 1991), has been described in severe chronic inflammatory immune responses such as autoimmune diseases and also in allergy (Miller et al., 1991; Karlsson et al., 2000; Winkler et al., 2003; Oliveira et al., 2005).

Exo_{Tol} pretreatment resulted in an inhibition of IgE and IgG1 antibody responses induced by Bet v 1 allergen. However, IgG2a antibody levels did not increase, although the measurement by ELISA may have limitations at low detection levels. Moreover, Exo_{Tol} pretreatment inhibited Th2 cytokines, without induced IFN-γ, a Th1 cytokine. These results suggest that the inhibitory effect on the immune response was not due to a shift towards a Th1-response. Although the precise mechanisms are still incompletely understood, bystander suppression is currently thought to be related to the effect of T regulatory cells and their suppressive cytokines such as TGF-β (Miller et al., 1991; Karlsson et al., 2000; Winkler et al., 2003). It has been described that tolerosomes, exosomes-like structures released from small intestinal epithelial cell, exhibit bystander suppression, being CD25⁺-Treg involved in this inhibitory phenomena (Karlsson et al., 2000). In our model, the inhibitory effect on the immune response to unrelated antigen by Exo_{Tol}-pretreatment cannot be explained only by active suppression, since there are no changes in the suppressive/regulatory cytokines IL-10 (Fig. 1C) and/or TGF-β (data not shown). Other immunological mechanisms may be involved in the indirect inhibitory effect induced by i.n. Exo_{Tol}-pretreatment as it has been suggested in other studies (Carvalho et al., 1997; Oliveira et al., 2005; Ramos et al., 2008).

The observed differences between the tolerogenic properties of these two types of exosomes could be explained by differences on their molecular composition. By delivering both antigen and tolerogenic signals to immune cells, Exo_{Tol} could help to the propagation of the immunosuppressive response, and this is important in terms of their potential use as therapeutic agents. These results are in agreement with the observation that the nature of immune response (i.e. tolerance versus priming) induced via exosomes may reflect the physiological state of the cell from which they are generated, which could result in different molecular composition of exosomes (Théry et al., 2009). For example, exosomes secreted by immature DCs, IL-10-treated DCs or FasL-expressing DCs exhibit tolerogenic properties (Pêche et al., 2003; Kim et al., 2006, 2005), whereas exosomes released by mature DCs – which were generated from bone marrow precursors under the influence of GM-CSF and treated with LPS – are immunogenic (Segura et al., 2005). In this sense, comparative proteomic analysis of BALF-derived exosomes from tolerized mice *versus* naïve animals could help to identify the molecules that are responsible of the tolerogenic properties.

In summary, our findings show that i.n. pretreatment with Exo_{Tol} specific to Ole e 1, in addition to inhibit specific immune response to this allergen (Prado et al., 2008), blocked the allergic response to a second unrelated allergen such as Bet v 1. The *in vivo* “bystander suppression” that we have herein described for tolerogenic exosomes may have implications in terms of their potential use as acellular vectors for allergy vaccination based on the induction of mucosal tolerance. The significance of these preliminary but promising findings awaits further experimentation.

Acknowledgments

We thank ALK-Abelló for kindly provided Bet v 1 allergen. Thanks are also extended to Dr. Clotilde Théry (Institut Curie, Paris, France) for reviewing the manuscript. Supported by grant SAF-2008-04053 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) to R.R. The authors have declared that they have no conflict of interest.

References

- Batanero, E., Barral, P., Villalba, M., Rodríguez, R., 2002. Sensitization of mice with olive pollen allergen Ole e 1 induces a Th2 response. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 127, 269–275.
- Carvalho, C., Verdolin, B., Vaz, N.M., 1997. Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression. *Scand. J. Immunol.* 45, 276–281.
- D'Amato, G., Spiekma, F.T., Liccardi, G., Jäger, S., Russo, M., Kontou-Fili, K., Nikkels, H., Wüthrich, B., Bonini, S., 1998. Pollen-related allergy in Europe. *Allergy* 53, 567–578.
- Delcayre, A., Estelles, A., Sperinde, J., Roulon, T., Paz, P., Aguilar, B., Villanueva, J., Khine, S., Le Pecq, J.B., 2005. Exosomes display technology: Applications to the development of new diagnostics and therapeutics. *Blood Cells, Mol. Dis.* 35, 158–168.
- Karlsson, M.R., Kahu, H., Hanson, L.A., Telemo, E., Dahlgren, U.I., 2000. Tolerance and bystander suppression, with involvement of CD25-positive cells, is induced in rats receiving serum from ovalbumin-fed donors. *Immunology* 100, 326–333.
- Kim, S.H., Bianco, N., Menon, R., Lechman, E.R., Shufesky, W.J., Morelli, A.E., Robbins, P.D., 2006. Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive. *Mol. Ther.* 13, 289–300.
- Kim, S.H., Lechman, E.R., Bianco, N., Menon, R., Keravala, A., Nash, J., Mi, Z., Watkins, S.C., Gambotto, A., Robbins, P.D., 2005. Exosomes derived from IL-10 treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 174, 6440–6448.
- Miller, A., Lider, O., Weiner, H.L., 1991. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J. Exp. Med.* 174, 791–798.
- Mothes, N., Horak, F., Valenta, R., 2004. Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 135, 357–373.
- Oliveira, C.R., Taniguchi, E.A.F., Fusaro, A.E., Victor, J.R., Brito, C.A., Duarte, A.J.S., Sato, M.N., 2005. Bystander effect in synergy to anergy in oral tolerance of *Blotia tropicalis*/ovalbumin murine co-immunization model. *J. Clin. Immunol.* 25, 153–161.
- Peche, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., Cuturi, M.C., 2003. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 76, 1503–1510.
- Prado, N., Marazuela, E.G., Segura, E., Fernández-García, H., Villalba, M., Théry, C., Rodríguez, R., Batanero, E., 2008. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerated mice prevent allergic reaction. *J. Immunol.* 181, 1519–1525.
- Ramos, G.C., Rodrigues, C.M., Azevedo, G.M., Pinho, V., Carvalho, C.R., Vaz, N.M., 2008. Cell-mediated immune response to unrelated proteins and unspecific inflammation blocked by orally tolerated proteins. *Immunology* 126, 354–362.
- Segura, E., Nicco, C., Lombard, B., Véron, P., Raposo, G., Batteux, F., Amigorena, S., Théry, C., 2005. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naïve T-cell priming. *Blood* 106, 216–223.
- Simons, M., Raposo, G., 2009. Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 1–7.
- Simpson, R.J., Lim, J.W.E., Moritz, R.L., Mathivanan, S., 2009. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert. Rev.* 6, 267–283.
- Théry, C., Ostrowski, M., Segura, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593.
- Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, M.L., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C., Rodríguez, R., 1993. The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur. J. Biochem.* 216, 863–869.
- Winkler, B., Bolwig, C., Seppälä, U., Spangfort, M.D., Ebner, C., Wiedermann, U., 2003. Allergen-specific immunosuppression by mucosal treatment with recombinant Ves v 5, a major allergen of *Vespa vulgaris* venom, in a murine model of wasp venom allergy. *Immunology* 110, 376–385.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DEL BALF MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FTIR Y ESTRATEGIAS ÓMICAS

Estudio comparativo mediante espectroscopía FTIR

En una primera aproximación, se llevó a cabo el análisis comparativo de los Exo_{Con} y Exo_{Tol} mediante espectroscopía FTIR, con el fin de determinar posibles cambios moleculares -a nivel de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y/o carbohidratos-, responsables de las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol}.

La espectroscopía FTIR ha emergido como una herramienta poderosa que permite analizar, de una forma rápida y fiable, la composición química de materiales orgánicos e inorgánicos, en estado sólido, líquido y gaseoso. Es una técnica no destructiva que no requiere de procesamiento especiales de las muestras, lo que constituye una ventaja frente a otros procedimientos de identificación derivados de la biología molecular o de la bioquímica tradicional. La espectroscopía FTIR trabaja con longitudes de onda de la región del infrarrojo medio (de 4.000 a 650 cm^{-1}) del espectro electromagnético [Quinteiro, 2000]. Esta radiación excita determinados enlaces intermoleculares provocando movimientos de estrechamiento y/o flexión. El modo de vibración resultante del estado excitado tiene lugar a longitudes de onda fija y el área delimitada en el pico está relacionada, de forma directa, con la cantidad de grupos funcionales que absorben a esa longitud de onda.

En el área de la bioquímica esta técnica permite el estudio simultáneo de varias biomoléculas, ya que las bandas de absorción de los distintos enlaces presentes en los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos se dan en regiones espectrales diferenciadas [Stuart, 1996; Naumann, 2000] (**Tabla 13**). Dado que prácticamente todas las sustancias absorben en el infrarrojo y presentan un espectro característico, esta técnica aporta una información útil sobre la composición y entorno en el que se encuentra el material [Ruddy *et al.* 2006; Kusano *et al.*, 2006]. Así el espectro de FTIR puede considerarse como una huella dactilar del sistema objeto de estudio.

Los espectros FTIR de los Exo_{Con} y Exo_{Tol} aislados del BALF de ratones presentaban bandas de absorción en las regiones asignadas a los enlaces presentes en los lípidos (regiones 1 y 2; 3.000-2.840 cm^{-1}), proteínas (regiones 3 y 4; 1.700-1.525 cm^{-1}) y carbohidratos/ácidos nucleicos (regiones 5, 6 y 7; 1.275-900 cm^{-1}) (**Figura 26A**). Desde un punto de vista cualitativo estas observaciones indicaban la presencia de dichas biomoléculas en los exosomas. En un primer análisis comparativo visual no se establecieron diferencias significativas entre los espectros de ambos tipos de microvesículas.

Con el fin de evaluar la magnitud de las posibles diferencias en los espectros de los exosomas, las 7 regiones espectrales -detalladas en la **Tabla 13**- se integraron y se normalizaron con respecto a la región 1, correspondiente a la banda de absorción del enlace carbonilo presente en los lípidos (**Figura 26B**). El análisis permitió detectar cambios entre los 2 tipos de microvesículas en las regiones 3 y 4, que corresponden respectivamente a los enlaces amida I y amida II presentes en las proteínas -con una pequeña contribución de otros enlaces amida como el presente en el lípido esfingomielinina [Gasper *et al.*, 2009]-. No se encontraron diferencias significativas en las otras regiones analizadas, en ninguno de los espectros adquiridos.

Tabla 13. Asignación de las bandas de absorción de FTIR de los exosomas.

Nº banda	Banda de absorción (cm ⁻¹)	Tipo de enlace	Modo de vibración	Biomoléculas	Referencias
1	2.950-2.880	-CH ₂ -	Estrechamiento	Lípidos	Pappas <i>et al.</i> , 2003 Mehrota <i>et al.</i> , 2010 Álvarez-Ordoñez <i>et al.</i> , 2011
2	2.860-2.840	-CH ₃	Estrechamiento	Lípidos	Pappas <i>et al.</i> , 2003 Mehrota <i>et al.</i> , 2010 Álvarez-Ordoñez <i>et al.</i> , 2011
3	1.700-1.600	Amida I, C=O C=C	Estrechamiento	Proteínas Ácidos nucleicos	Pappas <i>et al.</i> , 2003 Chen <i>et al.</i> , 2008 Lewis <i>et al.</i> , 2010
4	1.575-1.525	Amida II, NH C=N	Flexión Estrechamiento	Proteínas Ácidos nucleicos	Pappas <i>et al.</i> , 2003 Chen <i>et al.</i> , 2008 Lewis <i>et al.</i> , 2010 Álvarez-Ordoñez <i>et al.</i> , 2011
5	1.275-1.200	Amida III, C-N -OH	Estrechamiento Flexión	Proteínas Carbohidratos	Pappas <i>et al.</i> , 2003 Álvarez-Ordoñez <i>et al.</i> , 2011
6	1.120-1.000	C-O C-O	Estrechamiento Flexión	Carbohidratos	Chen <i>et al.</i> , 2008 Lewis <i>et al.</i> , 2010
7	1.000-900	PO ₂ ⁻ , PO ₄ ⁻ , C-C	Estrechamiento	Ácidos nucleicos Proteínas Carbohidratos	Chen <i>et al.</i> , 2008 Lewis <i>et al.</i> , 2010

Las diferencias observadas en el contenido proteico de los Exo_{Tol} podrían dar cuenta de sus propiedades inmunosupresoras. Sin embargo, no se descarta el hecho de que existan cambios en otro tipo de moléculas en los Exo_{Tol} como consecuencia de la inducción de tolerancia, no detectables mediante esta técnica. Esto hace necesario la utilización de otras técnicas más sensibles y específicas para este fin [Kazarian & Chan, 2013].

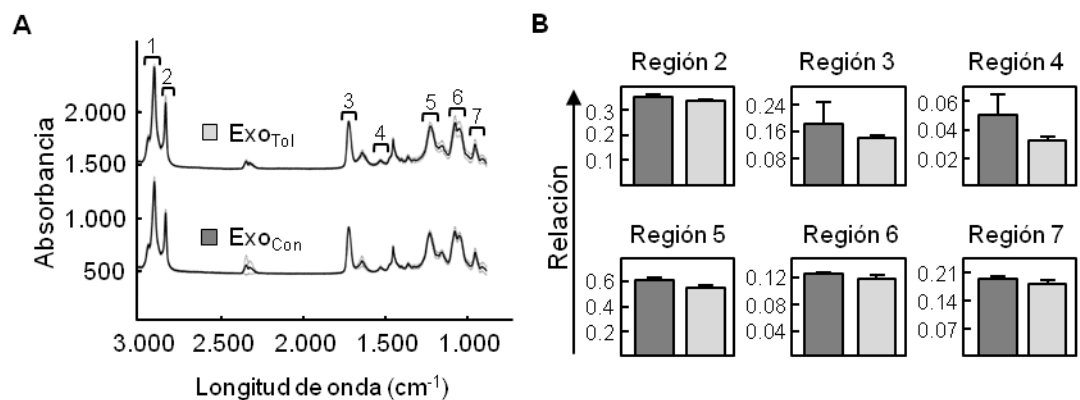


Figura 26. Estudio comparativo mediante espectroscopía FTIR de los Exo_{Con} y Exo_{Tol}. (A) Espectro promedio (línea continua) ± SD (línea discontinua) de los Exo_{Con} y Exo_{Tol}. Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por duplicado. Las regiones espectrales estudiadas se indican con números del 1 al 7. (B) Integración y normalización de las regiones espectrales estudiadas con respecto a la región 1, correspondiente a la banda de absorción del enlace carbonilo presente en los lípidos. Los datos corresponden a la media ± SEM (n=6).

Varios trabajos han señalado la utilidad de la espectroscopía FTIR para estudiar la composición bioquímica de diferentes sistemas biológicos, como células, tejidos animales, microorganismos, fármacos, alimentos y materiales vegetales [Chong & Wong, 1993; Stuart, 1996; Naumann, 2000; Lewis *et al.*, 2010; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011]. Esta técnica permite detectar, además, cambios moleculares específicos *in situ* [Goormaghtigh *et al.*, 1994], lo que podría estar relacionado con cambios en la función del sistema a estudiar [Cohenford *et al.*, 1998]. Diferentes estudios han observado que puede ser una herramienta de diagnóstico para determinados tipos de cáncer como el de próstata o el pulmonar, así como en enfermedades neurodegenerativas provocadas por proteínas priónicas [Lasch *et al.*, 2002; Erukhimovitch *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2010; Mehrotra *et al.*, 2010]. Esta técnica también ha sido utilizada en micología médica y, en general, en microbiología para identificar diferentes especies de hongos [Essendoubi *et al.*, 2005]. A pesar de los numerosos estudios llevados a cabo en diferentes sistemas biológicos la espectroscopía FTIR no se había empleando con anterioridad para la caracterización de exosomas, representando el estudio llevado a cabo en la presente tesis, la primera inclusión de esta técnica en el campo de estas microvesículas.

Dado que el estudio mediante espectroscopía FTIR reveló pequeñas diferencias en cuanto al contenido proteico de los Exo_{Con} y Exo_{Tol}, se procedió al análisis más detallado de dichas microvesículas mediante estrategias ómicas: proteómica y transcriptómica.

Estudio comparativo de los exosomas derivados del BALF mediante estrategias ómicas

Durante los últimos años, numerosos estudios han demostrado que los exosomas pueden transferir proteínas, mRNAs y miRNAs funcionales entre células, modificando las propiedades de la célula receptora [Ratajczak *et al.*, 2006; Deregibus *et al.*, 2007; Valadi *et al.*, 2007; Skog *et al.*, 2008]. Dado que la biogénesis de los exosomas tiene lugar en el compartimento endosomal de la célula, es razonable asumir que su carga molecular esté determinada tanto por el tipo de célula donadora como por su estado fisiopatológico. Esta dependencia de la carga molecular ha llevado a sugerir a algunos autores que los exosomas representan una versión en miniatura de la célula donadora [Théry *et al.*, 2009], constituyendo una fuente de biomarcadores estables y reproducibles en diferentes condiciones patológicas [Théry *et al.*, 2009; Chaput & Théry, 2011; Pant *et al.*, 2012].

Con estos antecedentes y a partir de los resultados obtenidos mediante FTIR, planteamos como hipótesis que ciertos componentes moleculares (proteínas, mRNAs y miRNAs) podrían estar implicados en las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol} derivados del BALF, observadas tras su administración i.n. en un modelo de ratón alérgico. La inducción de tolerancia a Ole e 1 ocasionaría modificaciones en el patrón de expresión de múltiples genes a nivel celular y, por lo tanto, en la carga de los exosomas. De esta forma, las propiedades tolerogénicas serían transferidas a la célula receptora a través de su carga exosomal activa. Con el fin de identificar las moléculas responsables de dichas propiedades, se estudió el proteoma y el transcriptoma de los Exo_{Tol} -en comparación con los Exo_{Con}- mediante espectrometría de masas (MS) y *microarrays* de DNA, respectivamente. Estas técnicas permiten identificar las proteínas y los genes expresados -tanto transcritos codificantes de proteínas como transcritos reguladores- expresados en un momento dado y bajo determinadas condiciones.

Análisis proteómico comparativo en los exosomas derivados del BALF

Para estudiar si la inducción de tolerancia mediante la administración i.n. de Ole e 1 había ocasionado modificaciones en el patrón proteico de los exosomas se utilizaron 2 abordajes diferentes: digestión trípica en gel y digestión -trípica y quimotríptica- en solución. En ambos casos los péptidos resultantes se separaron y analizaron mediante HPLC-MS/MS.

Digestión trípica en gel

Los exosomas se aplicaron en geles de PAGE-SDS en gradiente del 4 al 12% y las proteínas se visualizaron directamente mediante tinción con azul de Coomassie (**Figura 27**). Aparentemente, el patrón proteico de los Exo_{Tol} era similar al de los Exo_{Con}, por lo que se seleccionaron y recortaron 7 bandas, las cuales fueron sometidas a digestión trípica. Los péptidos resultantes se aplicaron en un sistema de HPLC-MS/MS, identificándose un total de 12 proteínas en ambos tipos de exosomas (**Tabla 14**).

Algunas de las proteínas identificadas en los exosomas derivados del BALF -tanto en los Exo_{Tol} como en los Exo_{Con}- han sido descritas previamente en exosomas de otras fuentes como: actina, anexina A5, enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), ICAM-1, albúmina sérica, proteína de choque térmico 5 (Bip), citocromo P450 y transferrina [Mathivanan & Simpson, 2009; Mathivanan *et al.*, 2010; Mathivanan *et al.*, 2012].

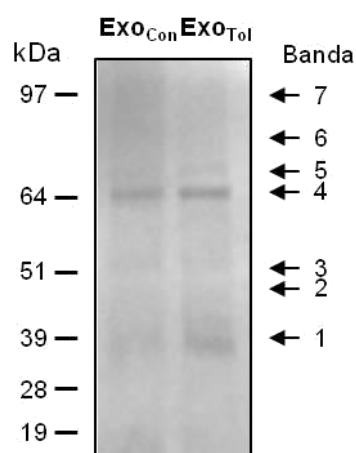


Figura 27. Análisis comparativo del contenido proteico de los exosomas derivados del BALF mediante PAGE-SDS y tinción con *Bio-Safe Coomassie Stain*. Se aplicaron 50 µg de proteína total de los Exo_{Con} y Exo_{Tol}. Se indican con una flecha (1-7) las bandas recortadas que se sometieron a digestión trípica seguida de HPLC-MS/MS. Las masas moleculares de los patrones se muestran en kDa.

ICAM-1 sólo se detectó en los Exo_{Tol}, aunque dicha molécula se había identificado en ambos tipos de exosomas mediante citometría de flujo y *Western blot*. Este resultado pone de manifiesto las limitaciones de la técnica, ya que ciertas proteínas pueden no identificarse por MS aunque estén presentes en las muestras [Kienzl-Wagner *et al.*, 2012]. ICAM-1 se considera un “marcador exosomal”, identificándose en una gran variedad de exosomas, como los derivados de: hepatocitos de rata [Conde-Vancells *et al.*, 2008], mastocitos de ratón [Skokos *et al.*, 2001], diferentes líneas celulares humanas [van Niel *et al.*, 2001; Looze *et al.*, 2009] y diferentes fluidos biológicos [Admyre *et al.*, 2003; Caby *et al.*, 2005].

Tabla 14. Proteínas identificadas en los Exo_{Con} y Exo_{Tol} mediante digestión triptica en gel seguida de HPLC-MS/MS.

Proteína	Acceso NCBI	Exo _{Con}	Exo _{Tol}	Longitud en aa	Coverage (%) Exo _{Con}	Coverage (%) Exo _{Tol}	Banda
Actin-1	NP_033739	+	+	375	33.1	36.1	2
Annexin A5	NP_033803	+	+	319	16.3	39.5	1
BRP39	CAA63603	+	+	381	15.3	26.7	4
Cytochrome P450	AAH24742	+	+	491	37.9	25.1	3
ALDH	NP_080592	+	+	468	9.6	13.2	3
Bip	NP_071705	+	+	655	11.0	14.0	4
Paraoxonase 1	NP_035264	+	–	355	13.8	–	2
ICAM-1	CAA34621	–	+	537	–	13.8	6
Serum albumin	CAA09617	+	+	608	26.3	33.1	5
SP-A	1908183A	+	+	248	13.7	22.6	1
SP-D	AAH03705	+	+	374	17.9	12.6	3
Transferrin	AAL34533	+	+	697	23.1	23.5	4

aa, aminoácidos; ALDH, aldehído deshidrogenasa; SP, proteína del surfactante pulmonar.

La paraoxonasa 1, una esterasa asociada con lipoproteínas de alta densidad, sólo se encontraba presente en los Exo_{Con}. Esta enzima ha sido identificada en exosomas derivados de una línea celular de hepatocitos de rata [Conde-Vancells *et al.*, 2008] y en exosomas humanos derivados del suero [Looze *et al.*, 2009], así como en el BALF de pacientes asmáticos [Wu *et al.*, 2005].

Aunque la mayor parte de las proteínas presentes en ambos tipos de microvesículas habían sido identificadas previamente en exosomas, otras se han descrito por primera vez, como: las proteínas del surfactante pulmonar SP-A y SP-D, y la proteína BRP39 (proteína homóloga a glucosil-hidrolasas). Hasta la fecha, ningún estudio había descrito la presencia de las proteínas del surfactante pulmonar en exosomas, detectándose únicamente el mRNA de SP-D en exosomas derivados de mastocitos de ratón [Valadi *et al.*, 2007].

Digestión triptica y quimotriptica en solución

Dado que el primer abordaje proteómico proporcionó escasa información, se llevó a cabo el estudio proteómico comparativo de los exosomas mediante digestión proteolítica -tríptica y quimotriptica- en solución seguida de HPLC-MS/MS. Se realizaron 2 digestiones independientes con ambas proteasas, con el fin de incrementar el número de péptidos identificados [Casado-Vela *et al.*, 2009]. Esta técnica permite determinar el proteoma global de un sistema, lo que resulta de gran ayuda para la identificación de proteínas como posibles biomarcadores de diferentes enfermedades [Adkins *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2004]. Los péptidos obtenidos fueron validados manualmente una vez comprobado que las tolerancias permitidas para la búsqueda eran correctas y se incluyó un filtro para restringir los falsos positivos al 1%.

El análisis proteómico permitió la identificación de 66 proteínas en los Exo_{Con} (Tabla 15) y 77 en los Exo_{Tol} (Tabla 16), de las cuales 27 eran comunes en ambos tipos de microvesículas (Tabla 17). Las proteínas identificadas se clasificaron siguiendo la terminología GO, según los procesos biológicos en los que participan y la función molecular que desempeñan [Ashburner *et al.*, 2000] (Figura 28). Los procesos biológicos que más porcentaje de proteínas incluyen son: metabolismo (Exo_{Con}, 15% y Exo_{Tol}, 14%), transporte (Exo_{Con}, 11% y Exo_{Tol}, 11%), regulación de los procesos biológicos (Exo_{Con}, 13% y

Exo_{Tol}, 12%) y organización celular y biogénesis (Exo_{Con}, 11% y Exo_{Tol}, 11%). La clasificación de las proteínas identificadas según la *función molecular* puso de manifiesto un elevado porcentaje de proteínas de unión tanto a proteínas (23% y 24%) como a iones metálicos (12% y 15%). Sin embargo, al comparar los porcentajes de las diferentes categorías en ambos tipos de exosomas no se encontraron diferencias que pudieran considerarse significativas, ya que solo se realizaron dos experimentos por digestión.

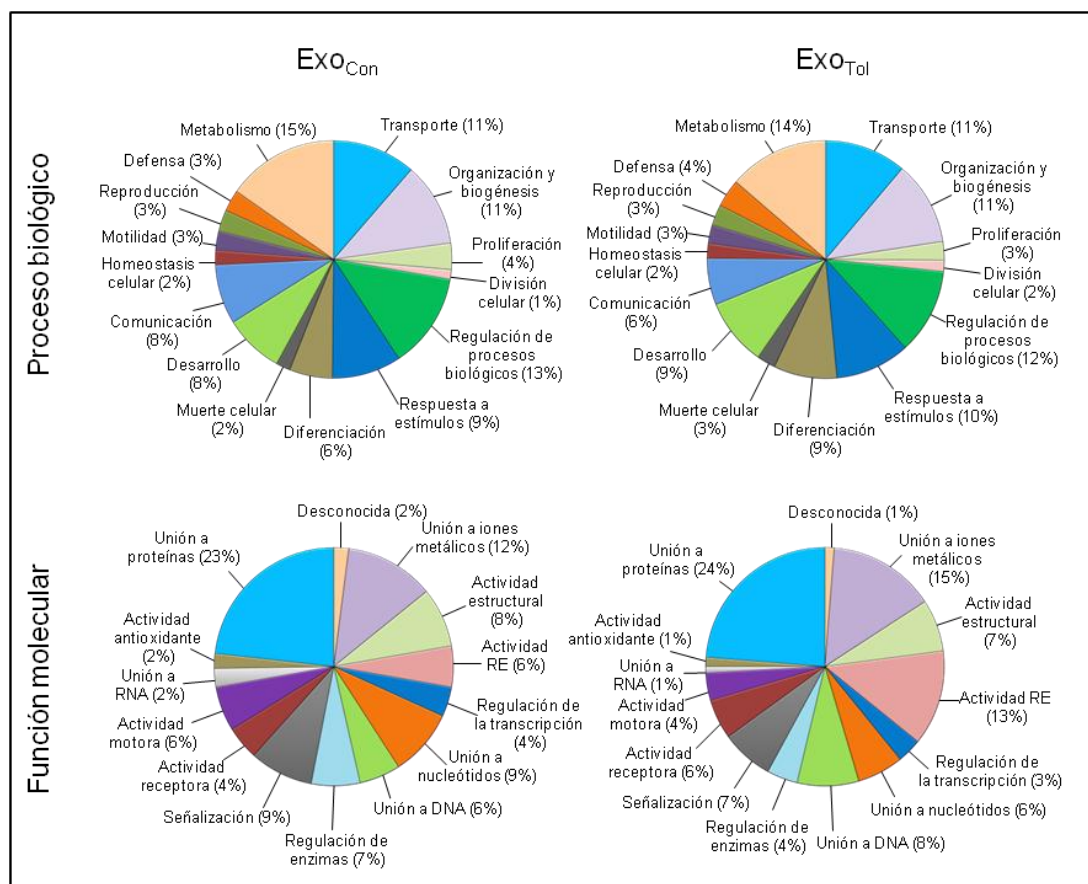


Figura 28. Clasificación de las proteínas de los exosomas derivados del BALF según la terminología GO. Las proteínas presentes en los Exo_{Con} y Exo_{Tol}, identificadas mediante digestión en solución seguida de HPLC-MS/MS, se clasificaron según el *proceso biológico* en el que participan y la *función molecular* que desempeñan. Entre paréntesis se indica el porcentaje de proteínas incluidas en cada grupo. RE, retículo endoplasmático.

El análisis mediante digestión en solución seguida de HPLC-MS/MS (Tablas 15, 16 y 17) confirmó la presencia de varias proteínas en los exosomas derivados del BALF: la actina, el citocromo P450, ICAM-1, la albúmina, SP-A, SP-D y la transferrina. Estos experimentos también permitieron confirmar la presencia del SP-B en ambos tipos de exosomas, detectado previamente mediante *Western blot* (Figura 14G). Por otra parte, SP-C se detectó exclusivamente en los Exo_{Con}. Un elevado número de las proteínas identificadas en este estudio proteómico han sido descritas previamente en exosomas derivados de diferentes fuentes [Mathivanan & Simpson, 2009; Mathivanan *et al.*, 2010; Mathivanan *et al.*, 2012]. Entre ellas destacamos: *proteínas del citoesqueleto*, moesina, vimentina y dineína 1; la isoforma M2 de la piruvato quinasa y la enzima ácido graso sintasa, *enzimas implicadas en el*

metabolismo de los carbohidratos y lípidos; y las *proteínas séricas* albúmina, transferrina, transtirretina, la subunidad beta 1/2 de la hemoglobina, la proteína del complemento C5 y la lipoproteína de baja densidad 1B.

Además algunas de las proteínas identificadas en los exosomas del BALF también han sido descritas en un estudio proteómico comparativo del BALF de personas alérgicas y sanas, antes y después de la provocación con el alérgeno, como la actina, la miosina, la albúmina sérica, la isoforma M2 de la piruvato quinasa, la dineína, la proteína S100-A8, la cadena pesada del inhibidor de la alfa tripsina, la transferrina y la lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos -también denominada lipocalina-2- [Wu *et al.*, 2005]. Esta última proteína también ha sido descrita en los exosomas derivados de las secreciones apicales de las células epiteliales traqueobronquiales [Kesimer *et al.*, 2009]. Así mismo, la proteína S100-A8 también está presente en los exosomas de la orina [Gonzales *et al.*, 2009] y la saliva [González-Begne *et al.*, 2009]. Por otra parte, la proteína coronina 1A, identificada exclusivamente en los Exo_{Tol}, ha sido descrita, también, en los exosomas de la saliva [Ogawa *et al.*, 2011]. Esta proteína está implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina que se expresa casi exclusivamente en las líneas hematopoyéticas [Roadcap *et al.*, 2008]. Durante los últimos años, se ha establecido que la coronina 1A juega un importante papel en la señalización vía TCR, siendo clave en la activación, migración y supervivencia de las células T [Föger *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2008; Shiow *et al.*, 2008; Ichikawa *et al.*, 2011]. Un trabajo reciente ha demostrado que la coronina 1A es esencial en la vía de señalización TGF- β /SMAD3 en las células Th17 [Kaminski *et al.*, 2011]. La presencia de la coronina 1A en los Exo_{Tol} nos permite sugerir que esta proteína participaría en la modulación de la respuesta de las células T, contribuyendo, de esta forma, al establecimiento de la tolerancia.

Otras de las proteínas identificadas en los exosomas del BALF son las histonas (histona H1, H2A, H2B, H3 y H4) y los factores de transcripción AP-1 y SOX-8. Estas proteínas nucleares también han sido descritas en los exosomas derivados de DCs, oligodendrocitos y mastocitos [Théry *et al.*, 2001; Krämer-Albers *et al.*, 2007; Valadi *et al.*, 2007; Mathivanan *et al.*, 2012]. Los 5 tipos de histonas se detectaron exclusivamente en los Exo_{Tol}. No obstante, todavía está por determinar si la presencia de las histonas se debe a un mecanismo de direccionamiento específico o es el resultado de una contaminación de la preparación con vesículas apoptóticas secretadas por células muertas. En este sentido, hay que mencionar que en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre el número total de células del BALF en los ratones tolerantes a Ole e 1 y los *naïve*. Tampoco se observaron cuerpos apoptóticos en las preparaciones de TEM. Por otra parte, la función de las histonas no se restringe al núcleo, donde actúan como soporte estructural de la cromatina y reguladores de la transcripción [Parseghian & Luhrs, 2006; Campos & Reinberg, 2009], sino que estas proteínas se pueden localizar fuera del núcleo e incluso en el espacio extracelular donde desempeñan funciones muy variadas y nuevas como componentes de señalización celular y del sistema inmune [Brinkman *et al.*, 2004; Kawasaki & Iwamuro, 2008]. La variedad de funciones biológicas de las histonas, dentro y fuera de la célula, ha llevado a proponerlas como agentes terapéuticos en trasplantes de órganos y enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide y las enfermedades infecciosas. Estudios preliminares con modelos de ratón han indicado que la inmunización i.n. con la histona H4 o sus péptidos T es efectiva en el tratamiento del lupus y de la artritis reumatoide, al inducir células Treg productoras de TGF- β [Wu *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2011]. Estas evidencias, junto al hecho de que se

localice exclusivamente en los Exo_{Tol}, nos llevan a proponer a la histona H4 como una de las proteínas responsables de las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol}, aunque se requieren futuros estudios para definir cuál es su papel en nuestro modelo animal.

Finalmente, algunas de las proteínas identificadas en los exosomas del BALF se han descrito por primera vez en este tipo de microvesículas, como la mucolipina-1 -un canal catiónico no selectivo implicado en la acidificación endosomal [Thompson *et al.*, 2007]-; la cadherina 23 -una proteína de unión a calcio implicada en adhesión celular [Apostolopoulou & Ligon, 2012]- y la metalopeptidasa 1 del retículo endoplasmático, Ermp1.

La proteómica permite la identificación de un gran número de proteínas presentes en una mezcla compleja. Sin embargo, esta técnica no refleja la totalidad del proteoma, ya que ciertos péptidos se pueden perder, de manera que la proteína sólo puede ser detectada con otras técnicas más sensibles [Kienzl-Wagner *et al.*, 2012]. Un claro ejemplo es MHC-I: la presencia de esta proteína en ambos tipos de exosomas ha sido demostrada mediante *Western blot* y citometría de flujo (**Figura 14D y F**), pero no ha sido identificada por proteómica. Aunque los datos de proteómica apoyan la presencia de todas las proteínas identificadas en los exosomas derivados del BALF, su presencia tendría que ser validada empleando otras técnicas, tales como *Western blot* y ensayos de inmunofluorescencia. Tampoco se han podido detectar con esta técnica los "marcadores exosomales" Alix, clatrina, Tsg101 y CD9, cuya presencia ha sido demostrada en experimentos previos mediante citometría de flujo y *Western blot* (**Figura 14D y F**).

Tabla 15. Proteínas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas exclusivamente en los exosomas control.

Proteína	Nº acceso IPI v.3.84	Gen	Longitud en aa ¹	Nº péptidos Exo _{Con} ²	EMPAI Exo _{Con}	COVERAGE (%) Exo _{Con}
Alpha-1-antitrypsin 1-3	IPI00123920.2	<i>Serpina1c</i>	412	1	0.18	4.61
Alpha-1-antitrypsin 1-4	IPI00123924.1	<i>Serpina1d</i>	413	1	0.17	3.87
Alpha-2-HS-glycoprotein	IPI00128249.1	<i>Ahsg</i>	345	1	–	5.22
Basophilic leukemia expressed protein BLES03	IPI00970649.1	<i>AI837181</i>	298	1	0.17	7.05
BTB/POZ domain-containing protein 6	IPI00928349.1	<i>Btbd6</i>	488	1	–	2.25
Complement C5	IPI00330833.4	<i>Hc</i>	1680	1	0.03	0.95
Corticosteroid-binding globulin	IPI00116105.1	<i>Serpina6</i>	397	1	0.15	3.78
Cytochrome P450 2F2	IPI00308328.3	<i>Cyp2f2</i>	491	2	0.21	4.89
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	IPI00119876.1	<i>Dync1h1</i>	4644	1	0.01	0.26
DNA repair protein RAD51 homolog 4	IPI00116701.1	<i>Rad51l3</i>	329	1	0.14	6.08
Fatty acid synthase	IPI00113223.2	<i>Fasn</i>	2504	1	0.02	0.68
Ferritin light chain 2	IPI00228379.5	<i>Ftl2</i>	183	1	0.21	8.74
Hypothetical protein LOC66501 isoform 1	IPI00113258.5	<i>1700029H14Rik</i>	237	1	0.31	8.44
Isoform 1 of 5-hydroxytryptamine receptor 4	IPI00122961.1	<i>Htr4</i>	388	1	–	4.64
Isoform 1 of CREB-regulated transcription coactivator 3	IPI00128519.2	<i>Crtc3</i>	619	1	0.12	2.10
Isoform 1 of Dymeclin	IPI00229780.1	<i>Dym</i>	669	1	0.10	1.20
Isoform 1 of Mucolipin-1	IPI00114839.1	<i>Mcoln1</i>	580	1	–	2.24
Isoform 1 of Transmembrane and coiled-coil domain-containing protein 6	IPI00109358.5	<i>Tmco6</i>	494	1	0.39	3.24
Isoform HMW of Kininogen-1	IPI00114958.1	<i>Kng1</i>	661	1	0.09	2.72
Isoform Mitochondrial of Glutathione reductase, mitochondrial	IPI00111359.2	<i>Gsr</i>	500	1	0.13	3.20
Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	IPI00987185.1	<i>Idi1</i>	227	1	0.21	4.85
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	IPI00622240.4	<i>Krt2</i>	707	2	0.12	2.97
Keratin, type II cytoskeletal 4	IPI00420312.4	<i>Krt4</i>	525	3	0.29	6.10
Moesin	IPI00110588.4	<i>Msn</i>	577	1	0.06	1.56
Nephrocystin-3	IPI00653384.1	<i>Nphp3</i>	1324	1	–	1.13
Nik-related protein kinase	IPI00128081.2	<i>Nrk</i>	1455	1	0.04	0.55
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4	IPI00110280.4	<i>Ppil4</i>	492	1	0.09	2.85
Pulmonary surfactant-associated protein C	IPI00128605.1	<i>Sftpc</i>	193	1	0.29	6.74
Radial spoke head protein 3 homolog A	IPI00118054.5	<i>Rsph3a</i>	516	1	–	3.49
Rho-associated protein kinase 2	IPI00108150.1	<i>Rock2</i>	1388	1	0.05	1.22
Serine protease inhibitor A3M	IPI00135635.1	<i>Serpina3m</i>	418	2	0.29	7.66
Serotransferrin	IPI00139788.2	<i>Trf</i>	697	3	0.13	6.31
Talpid3 protein isoform 2	IPI00112920.4	<i>2700049A03Rik</i>	1432	1	0.04	0.91
Testis-expressed protein 19.2	IPI00108359.1	<i>Tex19.2</i>	317	1	0.21	4.42
Transcription factor AP-1	IPI00121829.1	<i>Jun</i>	334	1	–	4.19
Transthyretin	IPI00127560.1	<i>Ttr</i>	147	1	0.78	17.01
Tyrosine-protein kinase RYK	IPI00128580.1	<i>Ryk</i>	594	1	0.14	2.02
Uncharacterized protein C8orf47 homolog	IPI00169624.1	<i>BC030476</i>	362	1	–	1.93
Zinc finger protein ZAC1	IPI00124603.1	<i>Plagl1</i>	704	1	–	2.41

¹Número de aminoácidos (aa). ²Los péptidos fueron validados manualmente.

Tabla 16. Proteínas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas exclusivamente en los exosomas tolerogénicos.

Proteína	Nº acceso IPI v.3.84	Gen	Longitud en aa ¹	Nº péptidos Exo _{Tol} ²	EMPAI Exo _{Tol}	COVERAGE (%) Exo _{Tol}
Afadin- and alpha-actinin-binding protein	IPI00121490.4	<i>Ssx2ip</i>	615	1	0.06	2.28
Angiotensinogen	IPI00320617.3	<i>Agt</i>	477	1	–	1.47
B-cell CLL/lymphoma 6 member B protein	IPI00129007.1	<i>Bcl6b</i>	474	1	0.10	2.74
Beta-hexosaminidase subunit beta	IPI00115530.1	<i>Hexb</i>	536	1	0.10	2.43
CD27 antigen	IPI00112752.1	<i>Cd27</i>	250	1	0.18	5.60
Coronin-1A	IPI00323600.4	<i>Coro1a</i>	461	1	–	2.60
Cytochrome P450 3A41	IPI00125340.1	<i>Cyp3a41b</i>	504	1	–	1.59
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3	IPI00123588.1	<i>Dyrk3</i>	586	1	0.06	2.05
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	IPI00118569.1	<i>Gna13</i>	377	1	0.10	1.86
Heme transporter HRG1	IPI00111694.3	<i>Slc48a1</i>	146	1	–	10.27
Hemoglobin subunit alpha	IPI00469114.5	<i>Hba-a1</i>	142	3	1.15	27.46
Hemoglobin subunit beta-2	IPI00316491.4	<i>Hbb-b2</i>	147	7	1.04	46.26
Hist2h2bb protein	IPI00124518.3	<i>Hist2h2bb</i>	120	1	0.47	12.50
Histone H1.2	IPI00223713.5	<i>Hist1h1c</i>	212	2	–	12.26
Histone H2A type 1-H	IPI00229544.3	<i>Hist1h2ah</i>	128	5	0.47	35.94
Histone H2B type 1-F/J/L	IPI00114642.4	<i>Hist1h2br</i>	126	5	2.16	37.30
Histone H3.2	IPI00705630.3	<i>LOC788077</i>	136	2	–	22.79
Histone H3.3	IPI00713695.3	<i>H3F3A</i>	136	2	–	22.79
Histone H3.3C	IPI00108200.2	<i>Gm7426</i>	135	1	0.33	10.37
Histone H4	IPI00698039.2	<i>LOC787485</i>	103	3	1.15	26.21
Isoform 1 of 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 13	IPI00122464.1	<i>Hsd17b13</i>	304	1	0.14	4.93
Isoform 1 of Cadherin-23	IPI00120997.1	<i>Cdh23</i>	3354	1	0.04	0.57
Isoform 1 of Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	IPI00407222.4	<i>Ermp1</i>	898	1	–	1.00
Isoform 1 of FACT complex subunit SSRP1	IPI00652593.2	<i>Ssrp1</i>	708	1	–	0.99
Isoform 1 of Intercellular adhesion molecule 1	IPI00122973.1	<i>Icam1</i>	537	1	0.11	2.79
Isoform 1 of Lymphocyte-specific helicase	IPI00121431.4	<i>Hells</i>	821	1	0.05	1.71
Isoform 1 of Myosin phosphatase Rho-interacting protein	IPI00125348.2	<i>Mrip1</i>	1024	1	–	1.17
Isoform 1 of Serine/threonine-protein kinase 6	IPI00125590.1	<i>Aurka</i>	395	1	0.09	3.80
Isoform 1 of Spermatogenesis-associated protein 1	IPI00108316.3	<i>Spata1</i>	444	1	0.09	2.48
Isoform 1 of Tenascin-R	IPI00227126.1	<i>Tnr</i>	1358	1	–	0.66
Isoform 1 of Teneurin-3	IPI00123783.2	<i>Odz3</i>	2715	1	–	0.26
Isoform 2 of Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	IPI00120643.1	<i>Kcnma1</i>	1196	1	0.05	1.25
Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	IPI00407130.4	<i>Pkm2</i>	531	1	0.07	2.64
Low density lipoprotein-related protein 1B	IPI00119787.4	<i>Lrp1b</i>	4630	1	0.01	0.28
Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	IPI00115941.3	<i>Lcn2</i>	200	1	0.39	7.00
Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1	IPI00126340.1	<i>Pmfbp1</i>	1022	1	0.03	1.47
Probable ribonuclease ZC3H12D	IPI00308549.7	<i>Zc3h12d</i>	533	1	0.08	2.44

Tabla 16. (Continuación) Proteínas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas exclusivamente en los exosomas tolerogénicos.

Proteína	Nº acceso IPI v.3.84	Gen	Longitud en aa¹	Nº péptidos Exo_{Tol}²	EMPAI Exo_{Tol}	COVERAGE (%) Exo_{Tol}
Prolactin regulatory element-binding protein	IPI00124980.1	<i>Preb</i>	417	1	0.14	3.60
Protein S100-A8	IPI00230768.5	<i>S100a8</i>	89	1	2.16	16.85
Putative uncharacterized protein	IPI00110089.1	<i>Smtn</i>	446	1	0.15	3.36
Putative uncharacterized protein	IPI00110658.1	<i>Hba-a1</i>	142	4	0.39	28.87
Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IPI00467447.3	<i>Iqgap1</i>	1657	1	0.03	1.15
Secernin-2	IPI00121931.1	<i>Scrn2</i>	425	1	0.15	3.53
Sodium-dependent phosphate transport protein 2B	IPI00321717.5	<i>Slc34a2</i>	697	1	–	0.86
Solute carrier family 22 member 12	IPI00117817.3	<i>Slc22a12</i>	553	1	0.23	2.89
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	IPI00118019.1	<i>Tnfrsf9</i>	256	1	–	3.52
Valyl-tRNA synthetase	IPI00130353.5	<i>Vars</i>	1263	1	–	1.74
Vimentin	IPI00227299.6	<i>Vim</i>	466	1	0.07	2.36
Wiskott-Aldrich syndrome protein homolog	IPI00108084.1	<i>Was</i>	520	1	0.15	4.04

¹Número de aminoácidos (aa).

²Los péptidos fueron validados manualmente.

Tabla 17. Proteínas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en ambos tipos de exosomas.

Proteína	Nº acceso IPI v.3.84	Gen	Longitud en aa ¹	Nº péptidos Exo _{Tol} ²	Nº péptidos Exo _{Con} ²	EMPAI Exo _{Tol}	EMPAI Exo _{Con}	COVERAGE (%) Exo _{Tol}	COVERAGE (%) Exo _{Con}
Actin, cytoplasmic 1	IPI00698900.1	<i>ACTB</i>	375	11	1	0.57	0.14	35.47	4.00
Actin, cytoplasmic 2	IPI00712838.1	<i>ACTG1</i>	375	4	2	0.67	0.29	20.53	7.73
Ankyrin repeat and SOCS box protein 8	IPI00153312.2	<i>Asb8</i>	288	1	1	0.27	0.27	4.86	4.86
ETS-related transcription factor ERF	IPI00124315.1	<i>AY036118</i>	259	1	1			5.79	5.79
Hemoglobin subunit beta-1	IPI00663327.1	<i>LOC100503164</i>	147	10	4	1.36	1.31	56.46	34.69
Isoform 1 of Keratin, type I cytoskeletal 10	IPI00798492.2	<i>Krt10</i>	570	1	1	0.09	0.09	2.11	2.11
Isoform 1 of Plasma glutamate carboxypeptidase	IPI00126050.3	<i>Pgcp</i>	470	1	1	0.12	0.12	3.40	3.40
Isoform 1 of X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1	IPI00110220.3	<i>Rpgrip1</i>	1331	1	1	–	–	1.05	1.05
Isoform D of Leukocyte tyrosine kinase receptor	IPI00108002.3	<i>Ltk</i>	888	1	1	0.07	0.07	2.70	2.25
Keratin, type II cytoskeletal 1	IPI00625729.2	<i>Krt1</i>	637	3	4	0.26	0.26	5.49	5.65
Keratin, type II cytoskeletal 5	IPI00139301.3	<i>Krt5</i>	580	4	4	0.35	0.35	7.59	7.59
Keratin, type II cytoskeletal 72	IPI00347096.2	<i>Krt72-ps</i>	520	1	1	0.08	0.08	2.31	2.31
Keratin, type II cytoskeletal 73	IPI00347110.2	<i>Krt73</i>	539	2	2	0.15	0.15	4.27	4.27
Keratin, type II cytoskeletal 75	IPI00221797.1	<i>Krt75</i>	551	3	3	0.24	0.24	6.53	6.53
Keratin, type II cytoskeletal 79	IPI00124499.2	<i>Krt79</i>	531	4	4	0.36	0.36	8.66	8.66
Keratin, type II cytoskeletal 8	IPI00322209.5	<i>Krt8</i>	490	2	2	0.15	0.15	4.49	4.49
Leucine-rich repeat and coiled-coil domain- containing protein 1	IPI00895264.1	<i>Lrrcc1</i>	1026	1	1	0.04	0.04	0.68	0.68
Napsin-A	IPI00113797.1	<i>Napsa</i>	419	1	4	0.29	0.67	4.30	11.22
Pulmonary surfactant-associated protein A	IPI00282403.2	<i>Sftpa1</i>	248	11	4	1.09	0.87	30.24	15.73
Pulmonary surfactant-associated protein B	IPI00117977.1	<i>Sftpb</i>	377	5	6	0.52	0.87	19.10	22.28
Pulmonary surfactant-associated protein D	IPI00117975.1	<i>Sftpd</i>	374	3	2	0.5	0.31	10.70	7.22
Serine protease inhibitor A3K	IPI00131830.1	<i>Serpina3k</i>	418	2	4	0.29	0.29	8.85	16.51
Serum albumin	IPI00131695.3	<i>Alb</i>	608	62	69	1.93	2.18	66.78	72.86
SPARC	IPI00126343.1	<i>Sparc</i>	302	1	1	–	–	5.63	5.63
Synaptonemal complex protein 1	IPI00123245.3	<i>Sycp1</i>	993	1	1	–	–	1.61	1.61
Transcription factor SOX-8	IPI00111141.1	<i>Sox8</i>	464	1	1	–	–	4.96	4.96
Uteroglobin	IPI00113547.1	<i>Scgb1a1</i>	96	2	8	–	2.16	32.29	59.38

¹Número de aminoácidos (aa).

²Los péptidos fueron validados manualmente.

Red de interacción entre las proteínas identificadas en los Exo_{Con} y Exo_{Tol}

Con el fin de analizar las relaciones funcionales en el conjunto de proteínas identificadas en los Exo_{Con} y Exo_{Tol} se utilizó el *software STRING*. Este *software* se basa en la hipótesis que, dentro de una red, aquellas proteínas que están involucradas en un mismo proceso biológico, tienden a presentar alta conectividad. *STRING* ejecuta una serie de algoritmos de predicción basados en el contexto genómico y en la transferencia de asociaciones/interacciones determinadas, a nivel experimental, de organismos modelo hacia otras especies, mediante relaciones de ortología de las respectivas proteínas (interólogos). Otra característica importante de *STRING* es el *score* de confianza probabilístico que asigna a todas las interacciones de la red. El *score* representa la probabilidad de que una asociación dada describa una relación funcional entre dos proteínas que sea, al menos, tan específica como la que existe entre un par de proteínas promedio anotadas en la misma ruta o red en la base de datos *KEGG* [Kanehisa *et al.*, 2012]. Las redes generadas por *STRING*, además de representar interacciones directas (físicas) entre proteínas, también incluye interacciones indirectas, es decir, proteínas que comparten vías metabólicas, proteínas co-reguladas a nivel transcripcional y proteínas que participan en un complejo multiproteico. Una de las limitaciones inherentes a este tipo de análisis es la dificultad que presenta la identificación de los términos genéticos debido a los problemas de sinonimia -un único nombre de gen puede tener un gran número de sinónimos- y, principalmente, la ambigüedad, originada cuando un mismo término se refiere a entidades genómicas distintas -un único nombre de gen puede referirse a múltiples genes-. Además, *STRING* considera que una interacción entre proteínas es de alta confianza si existen varias fuentes de información o métodos que la avalen. En consecuencia, las interacciones de proteínas verdaderas poco documentadas o apoyadas por varios métodos experimentales y/o informáticos, son ignoradas. Así, la red de interacción propuesta no representa muy probablemente al total de las proteínas asociadas con las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol}, pero sí nos ofrece indicios de qué procesos están sucediendo. En consecuencia, las predicciones deben ser validadas experimentalmente.

De las 116 proteínas identificadas en ambos tipos de exosomas, 8 no mostraron ninguna entrada en la base de datos *STRING*, en 75 el *software* no encontró interacciones de alta confianza -por lo que se omitieron- y sólo 33 permitieron obtener una red de interacción entre proteínas de alta confianza (0.7) (**Figura 29**). El análisis realizado con el *software STRING* resultó en un total de 7 *clusters* de interacción que fueron analizados según los términos y las anotaciones del consorcio GO [Ashburner *et al.*, 2000]. El programa ha incorporado automáticamente 10 interactores proteicos. A continuación, se describen las interacciones de las proteínas dentro de cada *cluster*. Para nombrar las proteínas y evitar confusiones se emplearon las abreviaturas de los genes incluidas en las **Tablas 15-17** sin cursiva.

El **cluster 1** está formado por 4 queratinas (Krt): Krt1, Krt5 y Krt10 -identificadas en ambos tipos de exosomas- y Krt4 -exclusivamente en los Exo_{Con}-. Los principales componentes del citoesqueleto de las células epiteliales son los filamentos intermedios (FI) de queratina tipo I y II. Su papel principal es mantener la integridad celular [Steinert *et al.*, 1984], aunque también participan en la señalización celular, regulando una gran variedad de eventos celulares, como la respuesta a estrés, la migración y la diferenciación [Helfand *et al.*, 2005; Herrmann *et al.*, 2007; Eriksson *et al.*, 2009]. Así, los FI de queratina juegan un importante papel en el mecanismo de adaptación a la hipoxia en las células epiteliales alveolares [Zhou *et al.*, 2008].

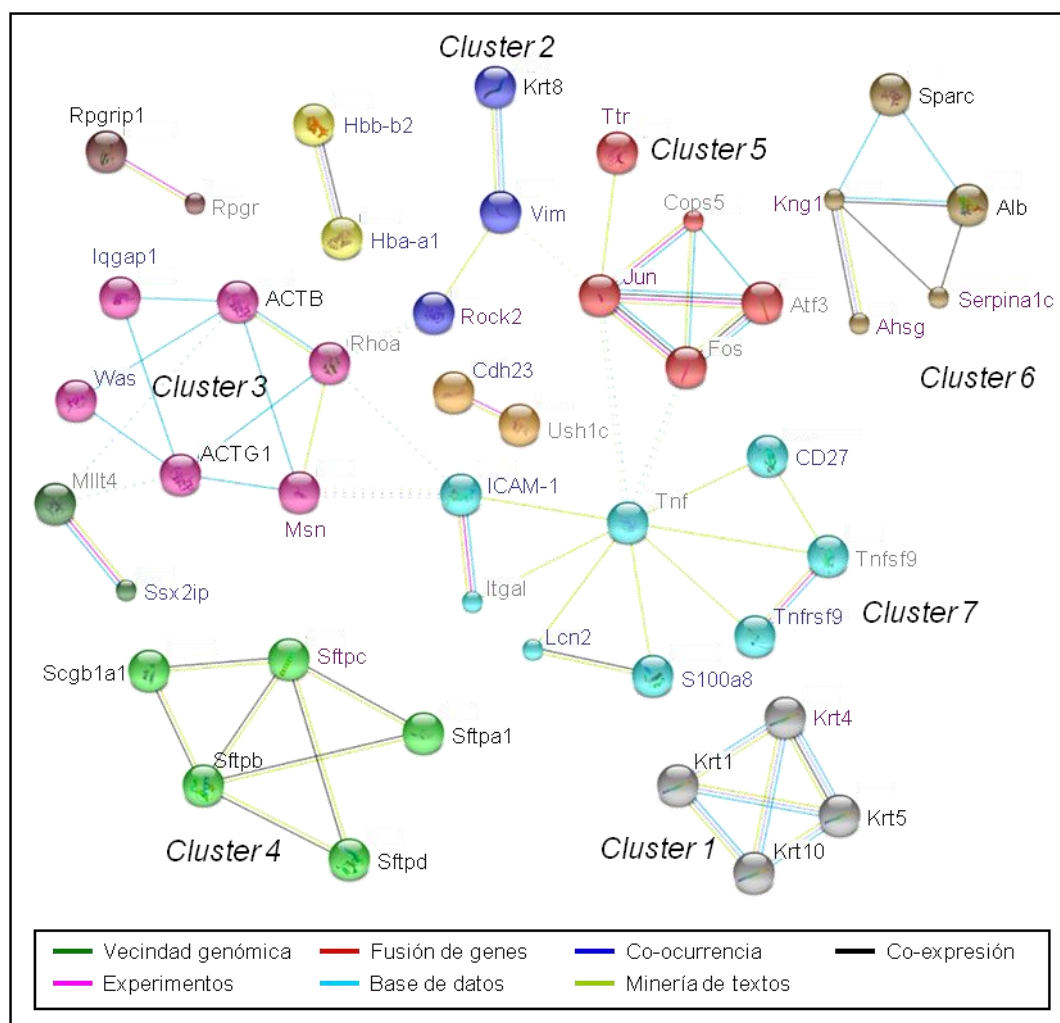


Figura 29. Red de interacción entre las proteínas identificadas en los exosomas derivados del BALF. Representación gráfica y agrupamiento en *clusters* de las proteínas (denominadas según la abreviatura del gen) identificadas mediante digestión en solución seguida de HPLC-MS/MS, utilizando el *software* STRING. Los nodos del gráfico representan las proteínas, mientras que los enlaces que unen los distintos nodos indican las relaciones existentes entre ellas, indicadas en la leyenda. Se omitieron los nodos que no presentaban ninguna conexión. En negro se muestran las proteínas identificadas comunes en ambos tipos de exosomas; en morado, las proteínas identificadas sólo en los Exo_{Con}; en azul, las proteínas identificadas exclusivamente en los Exo_{Tol} y en gris, las proteínas incluidas automáticamente por el *software*. El conjunto de datos se limita al organismo *Mus musculus*. El *score* de confianza aplicado fue 0.7 (confianza alta).

El **cluster 2**, asociado con el citoesqueleto y la transducción de señales, está constituido por 3 proteínas: Krt8, la vimentina (Vim) -identificadas en ambos tipos de exosomas- y la proteína quinasa asociada a Rho (Rock2) -identificada en los Exo_{Con}-. Además de su papel en el mantenimiento de la integridad celular, los FI actúan como proteínas de estrés: por ejemplo Krt8 es fosforilada durante diferentes formas de estrés celular, postulándose que la proteína protege los tejidos del daño, al actuar como amortiguador de la actividad quinasa inducida por el estrés [Ku & Omary, 2006]. La vimentina es la principal proteína fibrosa que forma los FI en las células mesenquimales, también se localizan en la musculatura lisa del sistema cardiovascular, pulmonar, digestivo y reproductor [Tang, 2008]. La vimentina desempeña un importante papel en la regulación de diversas funciones celulares, tales como, la resistencia frente a la tensión mecánica, la adhesión, la migración y la señalización celular [Ivaska et

al., 2007; Eriksson *et al.*, 2009]. Varios estudios han demostrado que los FI de vimentina, al igual que los de queratina, se reorganizan en células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos en respuesta a estímulos del entorno [Vikstrom *et al.*, 1991; Yoon *et al.*, 1998; Helfand *et al.*, 2005]. Existen numerosas evidencias del papel de los FI en la regulación y andamiaje de moléculas de señalización como las quinasas [Ehrenreiter *et al.*, 2005; Pallari & Eriksson, 2006; Ivaska *et al.*, 2006; Hyder *et al.*, 2008]. Un ejemplo de la interacción FI-quinasa es la interacción de la vimentina con la vía de señalización RAF-1/Rhoa, la cual, a través de las quinasas que une Rho (Rock2), está implicada en la regulación del citoesqueleto de actina y en la formación de las adhesiones focales [Sin *et al.*, 1998; Somlyo & Somlyo, 2000]. Rock2 fosforila a la vimentina lo que origina el colapso de los FI y su disociación de la vimentina, translocándose a la periferia de la célula [Sin *et al.*, 1998]. Recientemente, Rogel *et al.* [2011] han demostrado que la vimentina es necesaria y suficiente para incrementar el proceso de regeneración guiado por las células epiteliales alveolares en un modelo de daño pulmonar. Dichos autores encontraron que los niveles de expresión de vimentina aumentan en presencia de TGF- β 1 por la vía de señalización SMAD. Esto provoca un incremento en la motilidad celular que favorece la regeneración tisular.

Las actinas citoplasmáticas 1 (ACTB) y 2 (ACTG1) constituyen los nodos base del **cluster 3**, el cual está formado por un total de 6 proteínas: ACTB, ACTG1 -presentes en ambos tipos de exosomas-, las proteínas del síndrome Wiskott-Aldrich (Was) y la proteína activadora de GTPasa Ras (Iqgap1) -identificadas en los Exo_{Tol}-, la moesina (Msn) -en los Exo_{Con}- y la GTPasa Rhoa -incorporada automáticamente por el *software STRING*-. El citoesqueleto de actina es una estructura dinámica, capaz de integrar y responder a una gran variedad de estímulos, asegurando los cambios morfológicos, la motilidad intracelular, el deslizamiento de la célula, así como otros eventos celulares [Vartiainen, 2008]. En las células del sistema inmune el citoesqueleto de actina juega un papel clave en el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. Así, por ejemplo, la activación del TCR en las células T induce una reorganización del citoesqueleto de actina, requerida para su activación [Huang & Burkhardt, 2007]. Además, la formación de la sinapsis inmunológica entre la APC y la célula T depende de la polimerización de los filamentos de actina, que es catalizada por agentes de nucleación como Was [Huang & Burkhardt, 2007]. La organización y las funciones del citoesqueleto de actina son moduladas por vías de señalización que responden a estímulos que inciden sobre la membrana plasmática. La familia de GTPasas Rho -dentro de la superfamilia de proteínas Ras- actúan como interruptores moleculares en un complejo circuito de señalización que activan cascadas de quinasas, que regulan la dinámica de actina y microtúbulos, la adhesión celular, el deslizamiento y, por lo tanto, cualquier proceso que implique motilidad [Ridley, 2001]. De todas estas proteínas, Rhoa promueve la formación de fibras de estrés y el ensamblaje/desensamblaje de las adhesiones focales. Por otra parte, las proteínas ezrina/radixina/moesina (ERM) actúan como interconectores entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina e intervienen en varias vías de señalización celular [Shcherbina *et al.*, 1999]. Las ERM están ampliamente distribuidas y regulan la estructura y función de dominios específicos de la corteza celular, siendo componentes de las microvellosidades presentes en las células epiteliales, endoteliales y sensoriales. En resumen, las proteínas incluidas en este *cluster* están implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina y la señalización celular.

El **cluster 4** está formado por las 4 proteínas del surfactante pulmonar -SP-A (Sftpa1), SP-B (Sftpb), SP-C (Sftpc) y SP-D (Sftpd)- y la uteroglobina (Scgb1a1). Estas proteínas se han identificado en

ambos tipos de exosomas, a excepción de SP-C, sólo identificada en los Exo_{Con}. El surfactante pulmonar es un complejo lipoproteico que se encuentra recubriendo toda la interfase aire-líquido de la superficie alveolar, cuyas funciones principales son: evitar el colapso de los alveolos, defender al pulmón de la infección y la inflamación, y mantener la homeostasis del líquido alveolar. Sus 4 proteínas específicas son sintetizadas y secretadas por las células epiteliales alveolares de tipo II [Haagsman & Diemel, 2001], lo que sugiere que dichas células constituyen la principal fuente de los exosomas presentes en el BALF. Estas proteínas, además de jugar un papel clave en las propiedades fisiológicas del pulmón, intervienen en la defensa pulmonar al ser componentes importantes tanto de la inmunidad innata como adaptativa [Nayak *et al.*, 2012]. Además, SP-A y SP-D son colectinas, una familia de proteínas oligoméricas que contienen un dominio colágeno y un dominio lectina dependiente de calcio que une carbohidratos. Ambas proteínas participan en un amplio rango de funciones inmunes en el pulmón, así como en sitios extrapulmonares [Nayak *et al.*, 2012]. SP-A y SP-D unen varios tipos de ligandos de microorganismos patógenos, alérgenos y células apoptóticas/necróticas a través de su dominio lectina, mientras que su dominio colágeno les permite interaccionar con células del sistema inmune -como macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos- activándolas [Nayak *et al.*, 2012]. De esta forma, SP-A y SP-D juegan un papel central en la protección del pulmón frente a las infecciones respiratorias y en los procesos inflamatorios, como la alergia y el asma. En los últimos años, numerosos estudios han demostrado que estas colectinas son capaces de modular la función de las DCs y la polarización de las células Th, actuando como conectores entre la inmunidad innata con la adaptativa [Nayak *et al.*, 2012]. SP-A y SP-D unen diferentes alérgenos derivados de polen [Malhotra *et al.*, 1993; Schleh *et al.*, 2010], hongos [Madan *et al.*, 2001] y ácaros [Wang *et al.*, 1998]. Las propiedades terapéuticas de SP-A y SP-D se han ensayado en modelos de ratón alérgico. Por ejemplo, la administración i.n. de SP-D a ratones alérgicos a los alérgenos de ácaros, inhibe los niveles séricos de IgE específica, la eosinofilia pulmonar y periférica, además de inducir la polarización a Th1 [Singh *et al.* 2003]. Por último, estudios realizados con ratones deficientes en SP-A y SP-D han demostrado el importante papel de estas proteínas en conferir protección frente a la sensibilización alérgica [Madan *et al.*, 2005; Erpenbeck *et al.*, 2006]. Por otra parte, SP-B y SP-C son proteínas pequeñas e hidrofóbicas que están implicadas en el ciclo metabólico del surfactante y modulan las propiedades tensoactivas del mismo. Además, SP-C parece jugar un papel importante en la defensa inmune innata del pulmón frente a patógenos [Glasser *et al.*, 2009]. La uteroglobina es una proteína de secreción, pequeña y multifuncional, con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras en pulmón [Mukherjee *et al.*, 1999; Mandal *et al.*, 2004]. Pertenece a la superfamilia de las secretoglobinas y se expresa constitutivamente en los epitelios que revisten los órganos que comunican con el exterior, como los pulmones [Klug *et al.*, 2000]. El tratamiento con la proteína recombinante es capaz de suprimir una reacción alérgica frente OVA, tanto *in vivo* como *in vitro*, al bloquear la activación de NF-κB mediada por el receptor de la prostaglandina D₂, y la expresión del gen COX-2 de la ciclooxigenasa 2, una enzima crítica para la síntesis de mediadores lipídicos inflamatorios [Mandal *et al.*, 2004]. En resumen, todas las proteínas del *cluster* 4, producidas por las células epiteliales, son componentes esenciales en el mantenimiento de la homeostasis del pulmón y en su defensa.

El factor de transcripción Jun es el nodo central del **cluster 5**, formado por 5 proteínas: Jun y transtirretina (Ttr) que han sido identificadas en los Exo_{Con}, mientras que las proteínas Cops5, Atf3 y Fos

han sido incluidas automáticamente por el *software STRING*. La transtirretina es un transportador sérico y del fluido cerebroespinal de tiroxina (hormona T4). También forma complejos con la proteína transportadora del retinol, modulando el transporte de la vitamina A [Hyung *et al.*, 2010]. La agregación de la transtirretina está relacionada con enfermedades amiloides, cardiopatías, así como determinados tipos de cánceres [Saraiva, 1995; Sarhill *et al.*, 2003; Dungu *et al.*, 2012]. Jun se activan en presencia de señales mitogénicas controlando la diferenciación, proliferación y apoptosis celular [Ameyar *et al.*, 2003; Hess *et al.*, 2004]. La sobreexpresión de Jun se ha observado en numerosos tipos de cánceres [Shaulian, 2010].

El **cluster 6** está formado por el quinínógeno-1 (Kng1), que se encuentra relacionado con la glicoproteína α -2-HS (Ahsg), la α 1-antitripsina (Serpina1c) -identificadas exclusivamente en los Exo_{Con}-, la albúmina sérica (Alb) y la osteonectina (Sparc) -identificadas en ambos tipos de microvesículas-. El Kng1 es un factor de coagulación, mientras que la Ahsg es un transportador de fosfato cálcico muy importante para el desarrollo de los huesos [Shanahan, 2005]. La Serpina1c es el inhibidor de proteasas más abundante del suero [Axelsson & Laurell, 1965]. Los miembros de la familia de proteínas Sparc tienen funciones muy variadas, tales como la regulación del ensamblaje, la deposición de la matriz extracelular y la modulación de las vías de señalización a través de factores de crecimiento y citoquinas [Bradshaw, 2012]. La identificación de estas proteínas, principalmente presentes en el suero, puede ser debido a que durante el intercambio gaseoso que tiene lugar en los alveolos pulmonares se extravasen una parte de los exosomas del suero al BALF.

El **cluster 7**, formado por 8 proteínas, es el agrupamiento más grande que tiene como nodo central el factor de necrosis tumoral (TNF). Cuatro de las proteínas de este *cluster* han sido identificadas en los Exo_{Tol} -CD27, uno de los miembros de la superfamilia de receptores de TNF (Tnfrsf9), S100-A8, la lipocalina-2 (Lcn2) e ICAM-1, mientras que TNF, el ligando de Tnfrsf9 (Tnfsf9) y la cadena α de la integrina LFA-1 (Itgal o CD11a) han sido incluidos automáticamente por el *software STRING*. CD27 y Tnfrsf9 proporcionan señales coestimuladoras a las células T necesarias para la generación de una respuesta inmune efectiva [Croft, 2003]. Los miembros de esta superfamilia de receptores, junto con sus ligandos, como la citoquina proinflamatoria TNF y Tnfsf9, participan en la respuesta inflamatoria [Bazzoni & Beutler, 1996]. También S100-A8, una proteína que une calcio y zinc, juega un papel importante en la regulación de los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune [Ryckman *et al.*, 2003]. Su actividad proinflamatoria incluye el reclutamiento de leucocitos, la producción de citoquinas y quimioquinas, y la regulación de la adhesión y migración de leucocitos [Passey *et al.*, 1999]. Actúa como una alarmina y estimula a las células del sistema inmune innato a través de su unión al receptor Toll tipo 4 (TLR4) y al receptor de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) [Ehrche *et al.*, 2009]. Otra molécula que regula la inflamación es Lcn2, un miembro de la familia de las lipocalinas que se expresa en las mucosas, como las de la tráquea, del pulmón, del estómago, de glándula salivar y del colon [Cowland & Borregaard, 1997]. Lcn2 media la respuesta inmune innata al unir sideróforos producidos por bacterias patógenas -como *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis*-, lo que resulta en la inhibición del crecimiento bacteriano [Flo *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2006]. Esta proteína, en combinación con la transferrina, confina las bacterias en las vías aéreas y protege el espacio perivascular previniendo la propagación sistémica del patógeno. Además, promueve el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la inflamación. Recientemente, se ha demostrado que Lcn2 regula la inflamación pulmonar durante la

infección micobacteriana, al inhibir la expresión de la quimioquina inflamatoria CXCL9 [Guglani *et al.*, 2012]. Por otra parte, CD11a forma, junto con CD18, la integrina LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*), que se expresa en todos los leucocitos [Shimaoka *et al.*, 2003]. Esta molécula juega un papel central en la adhesión intracelular a través de su interacción con su ligando ICAM-1 y también funciona en la señalización coestimuladora de linfocitos. Así, las proteínas que integran el *cluster 7* participan en la respuesta inmune, regulando los procesos inflamatorios. Por último, cabe señalar, que este *cluster* interacciona con proteínas del *cluster 3*, asociado con la regulación del citoesqueleto de actina, y del *cluster 5* implicado en la señalización celular a través de las proteínas ICAM-1 y TNF, respectivamente, lo que pone de manifiesto la interrelación entre estos tipos de procesos para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva.

En resumen, la red de interacción entre proteínas resultante del presente estudio está compuesta por moléculas que participan principalmente en la regulación del citoesqueleto de actina, la defensa del pulmón y en la regulación de la respuesta inflamatoria. La red de interacción nos ofrece indicios de probables proteínas asociadas con las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol}. Este es el caso de las proteínas histona H4, coronina 1A, SP-A y SP-C; de las cuales es conocido su papel en la respuesta inmune. Otras proteínas candidatas atendiendo al grado de conectividad observado en la red de interacción entre proteínas son: las actinas ACTG1 y ACTB del *cluster 3*, asociadas a la regulación del citoesqueleto de actina; SP-B y SP-C del *cluster 4* asociado con la defensa del pulmón. Serán necesarios futuros estudios para demostrar el papel de estas proteínas en la supresión de la reacción alérgica.

Análisis transcriptómico comparativo de los exosomas derivados del BALF

Desde que en 1.995 Schena publicó el primer estudio en el que se utiliza una plataforma de *microarray* para monitorizar la expresión de varios genes en paralelo, en *Arabidopsis thaliana* [Schena *et al.*, 1995], el uso de esta técnica se ha ido extendiendo progresivamente. Este tipo de plataformas tecnológicas de alto rendimiento permiten estudiar, simultáneamente, el nivel de transcritos de miles de genes (sondas) en una misma muestra y experimento. Los *microarrays* se pueden utilizar, por ejemplo, para el análisis del polimorfismo entre individuos de la misma especie, para predecir el pronóstico de determinadas enfermedades o para estudiar aquellos cambios en la expresión génica bajo diferentes condiciones [Dalby *et al.*, 2012; Muff *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012]. Los experimentos con *microarrays* generan grandes cantidades de datos que deben ser procesados, analizados e interpretados para encontrar resultados significativos. Al tratarse de una técnica relativamente nueva, la mayor parte de los métodos, protocolos y estándares, aún se están optimizando.

Para el estudio transcriptómico comparativo, se llevaron a cabo experimentos con *microarrays* de DNA a partir de los exosomas derivados del BALF de ratones *naïve*, tras la inducción de tolerancia a Ole e 1. Se realizaron dos experimentos independientes para analizar la reproducibilidad de los resultados. El factor limitante en este estudio fue la cantidad de muestra biológica (exosomas) requerida, ya que se necesitaron 40 ratones *naïve* y 40 tolerantes a Ole e 1, por experimento, con el fin de obtener la cantidad adecuada de RNA total. No se observaron diferencias significativas en el contenido de RNA total aislado entre los 2 tipos de exosomas: 54.87 ± 8.6 ng/μl y 47.28 ± 4.06 ng/μl para los Exo_{Con} y Exo_{Tol}, respectivamente.

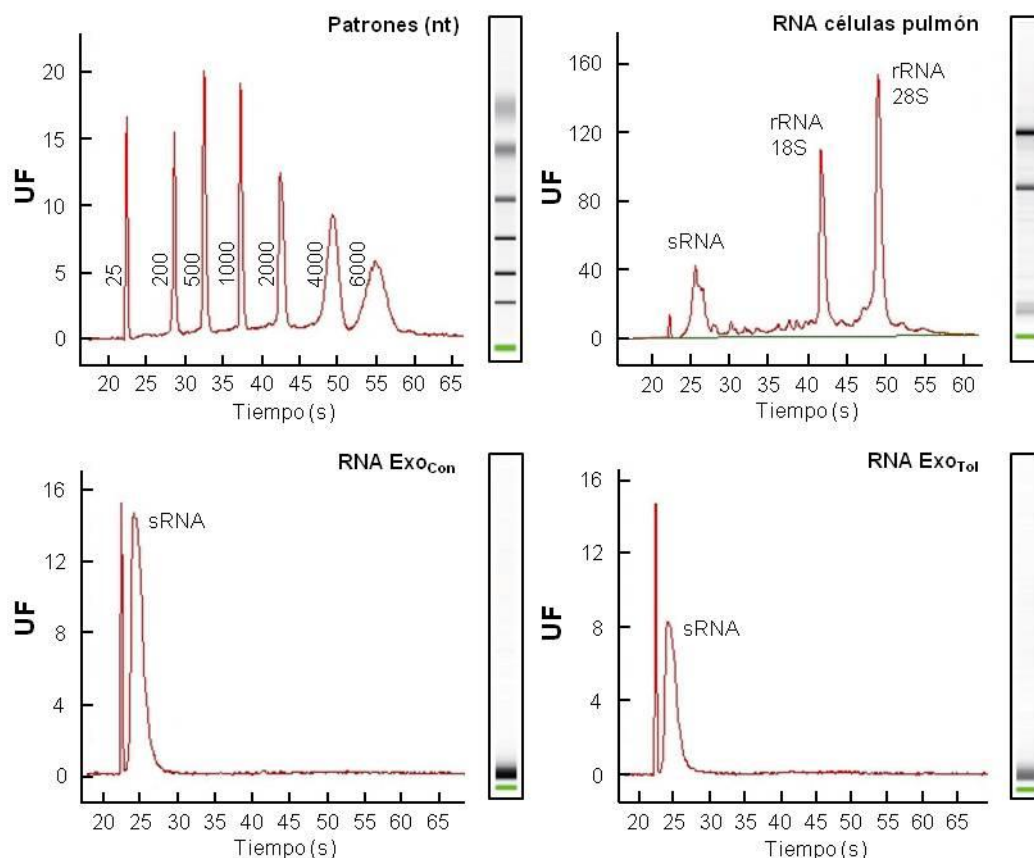


Figura 30. Electroferogramas de RNA total aislado a partir de los exosomas derivados del BALF de ratón. El análisis de RNA se llevó a cabo en un *Bioanalyzer 2100B* (Agilent). El RNA total se aisló a partir de células de pulmón (1×10^6 células), Exo_{Con} (400 μ g) y Exo_{Tot} (400 μ g). A la derecha del electroferograma se representa una electroforesis virtual de la muestra. En los patrones de RNA se indican los tamaños en nucleótidos (nt). Además, se señalan los rRNAs 18S y 28S, y los sRNAs. UF, unidades de fluorescencia.

El análisis del tamaño de las especies de RNA presentes en las muestras de RNA total y el control de calidad de las mismas se llevaron a cabo en un *Bioanalyzer 2100B*. El electroferograma de RNA total procedente de los exosomas se diferenciaba sustancialmente del obtenido para las células de pulmón (**Figura 30**). Este último se caracterizaba por la presencia de dos picos correspondientes a los RNA ribosómicos (rRNAs) 18S (~ 1.900 nucleótidos -nt-) y 28S (~ 4.700 nt), que son los más abundantes en las células eucariotas. Además, se detectó un pico de menor intensidad y más ancho que correspondía a los RNAs pequeños (sRNAs), con longitudes < 200 nt, que incluyen, entre otros: los mRNAs, los de transferencia (tRNAs) (70-90 nt), los rRNAs 5S (100 nt) y 5.8S (150 nt), así como a los miRNAs (~ 22 nt). El electroferograma de RNA total exosomal -tanto Exo_{Con} como Exo_{Tot}- se caracterizaba por la presencia de un único pico con un tamaño < 200 nt, lo que indicaba que los exosomas se encontraban enriquecidos en sRNAs. Este resultado concordaba con lo descrito previamente para exosomas derivados de otras fuentes biológicas, tanto de líneas celulares como de fluidos biológicos [Deregibus *et al.*, 2007; Valadi *et al.*, 2007; Skog *et al.*, 2008; Palanisamy *et al.*, 2010; Lässer *et al.*, 2012].

Expresión diferencial de genes

La estrategia de trabajo, mediante *microarrays* de DNA, utilizada para analizar la expresión diferencial de genes en los exosomas del BALF en la condición de tolerancia con respecto a la basal, se muestra en la **Figura 31**.

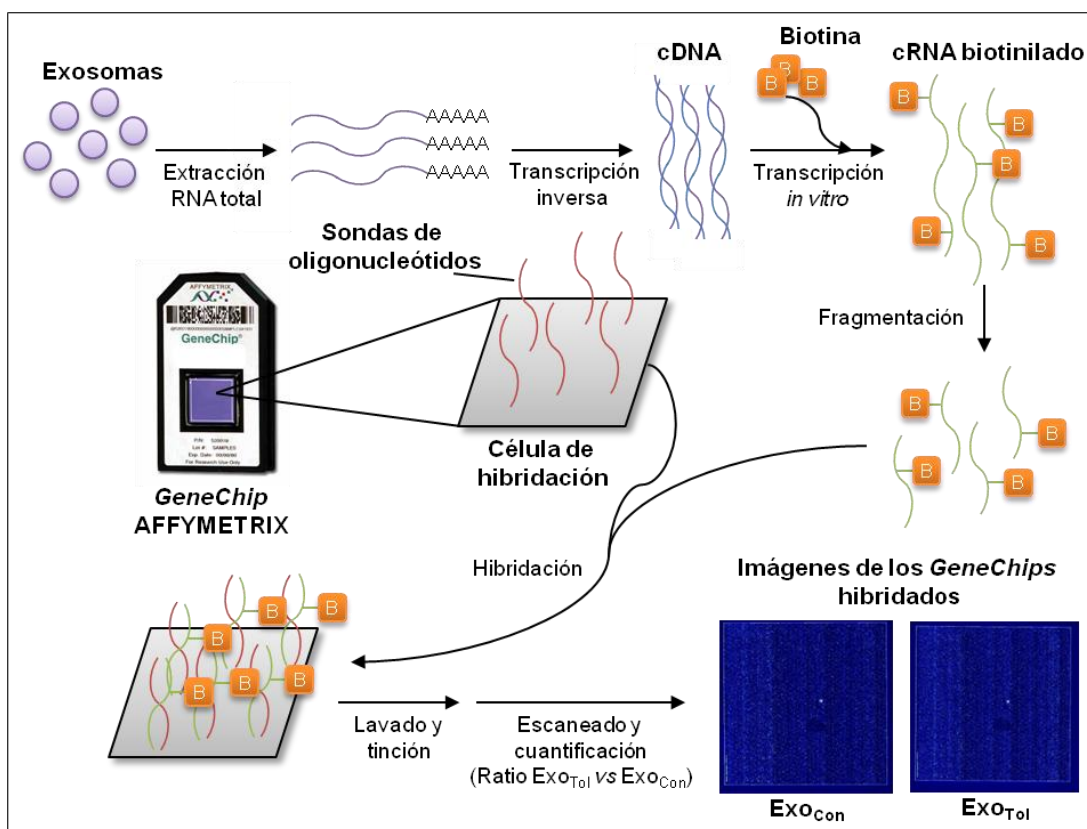


Figura 31. Estrategia de trabajo para el estudio de la expresión diferencial entre los Exo_{Tol} y Exo_{Con}, mediante *microarrays* de DNA. El *microarray* (GeneChip mouse genome 430A 2.0, Affymetrix) es una superficie de cristal de varios milímetros de área sobre la que se han sintetizado *in situ*, mediante fotolitografía, 22.690 sondas que están identificadas con 14.000 genes de ratón, cuya expresión se quiere cuantificar mediante la hibridación con el RNA de los Exo_{Tol} y Exo_{Con}. El grado de hibridación por complementariedad entre la sonda de oligonucleótidos y el RNA exosomal se pone de manifiesto mediante una señal, medida por análisis de imagen, que es proporcional a la expresión del gen de cada sonda en cada muestra problema. Once pares de sondas de oligonucleótidos específicas se utilizan para medir el nivel de expresión de cada gen representado en el *microarray*. Los datos obtenidos se normalizaron y se analizaron estadísticamente mediante el test *t* de Student. Se muestran unas imágenes representativas digitalizadas de la hibridación de cRNA exosomal -Exo_{Con} y Exo_{Tol}- al *microarray*.

En el análisis con *microarrays* de DNA se detectaron un total de 22.112 transcritos de genes (sondas) de alta calidad. Entre éstos se encontraron 117 diferencialmente expresados en los exosomas del BALF de ratón en relación con la inducción de tolerancia a Ole e 1. Seleccionando un cambio de expresión ≥ 1.8 y ≤ 0.65 , se identificaron un total de 74 genes sobreexpresados (**Tabla 18**) y 43 genes reprimidos (**Tabla 19**), respectivamente, con una significancia estadística de $p < 0.05$. Se empleó la abreviatura de los genes en cursiva para denominar los genes y sin cursiva para hacer referencia a las proteínas.

Los 10 genes expresados en mayor nivel en los exosomas del BALF tras inducir tolerancia fueron: *A530054K11Rik*, *Prl3d1*, *Vmn2r43*, *Gm5169*, *Vmn1r101*, *Gm5930*, *Vmn1R158*, *Vmn1r-ps79*, *Tex24* y *Gm10058*; y los 10 más reprimidos fueron: *Gm10050*, *Spdef*, *Srgap1*, *Frs3*, *Evx2*, *Rbm15b*, *Ucp3*, *H2-Q8*, *2810428I15Rik* y *5930403L14Rik*. Es interesante destacar que se detectaron los transcritos de los genes de todas las proteínas identificadas en los estudios proteómicos. Sin embargo, estos genes mostraron un nivel expresión sin significancia estadística, a excepción de los genes de la histona 3 familia 3A (*H3f3a*), de la histona H4 (*Hist1h4c*) y del factor de transcripción *AY036118*, cuyos valores de expresión (1.64, 0.51 y 0.66, respectivamente) sí presentaron significancia estadística.

Tabla 18. Genes sobreexpresados en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, identificados mediante *microarrays* de DNA.

Gen	Acceso	Abreviatura	Ratio Exo _{Tol} vs Exo _{Con} ¹	valor p^2
<i>RIKEN cDNA A530054K11 gene</i>	NM_183146	<i>A530054K11Rik</i>	2.441 ± 0.018	0.00067
<i>Prolactin family 3, subfamily d, member 1</i>	NM_008864	<i>Prl3d1</i>	2.429 ± 0.888	0.00578
<i>Vomeronasal 2 receptor 43</i>	NM_198961	<i>Vmn2r43</i>	2.420 ± 0.063	0.00064
<i>Predicted gene 5169</i>	NM_001040669	<i>Gm5169</i>	2.401 ± 0.050	0.01159
<i>Vomeronasal 1 receptor 101</i>	NM_001166836	<i>Vmn1r101</i>	2.391 ± 0.123	0.00093
<i>Predicted gene 5930</i>	ENSMUST00000111864	<i>Gm5930</i>	2.358 ± 0.349	0.01898
<i>Vomeronasal 1 receptor 158</i>	NM_001166841	<i>Vmn1r158</i>	2.341 ± 0.100	0.00196
<i>Vomeronasal 1 receptor, pseudogene 79</i>	NR_030707	<i>Vmn1r-ps79</i>	2.314 ± 0.216	0.00581
<i>Testis expressed gene 24</i>	NM_001013609	<i>Tex24</i>	2.307 ± 0.591	0.00345
<i>Predicted gene 10058</i>	NM_001109969	<i>Gm10058</i>	2.305 ± 0.188	0.01231
<i>Vomeronasal 1 receptor 114</i>	NM_001166837	<i>Vmn1r114</i>	2.301 ± 0.198	0.00770
<i>Vomeronasal 1 receptor 100</i>	NM_001166844	<i>Vmn1r100</i>	2.298 ± 0.235	0.00211
<i>Vomeronasal 1 receptor 151</i>	NM_001166712	<i>Vmn1r151</i>	2.277 ± 0.137	0.00412
<i>Olfactory receptor 1148</i>	NM_001011519	<i>Olfr1148</i>	2.259 ± 1.778	0.04032
<i>Vomeronasal 1 receptor 93</i>	NM_207547	<i>Vmn1r93</i>	2.256 ± 0.179	0.00754
<i>Vomeronasal 1 receptor 148</i>	NM_030736	<i>Vmn1r148</i>	2.249 ± 0.265	0.00528
<i>Vomeronasal 1 receptor 103</i>	NM_001166737	<i>Vmn1r103</i>	2.246 ± 0.135	0.00580
<i>Predicted gene 10670</i>	NM_001167161	<i>Gm10670</i>	2.241 ± 0.207	0.00947
<i>Vomeronasal 1 receptor 117</i>	NM_001166743	<i>Vmn1r117</i>	2.241 ± 0.011	0.00428
<i>Vomeronasal 1 receptor 122</i>	NM_001166714	<i>Vmn1r122</i>	2.223 ± 0.242	0.00745
<i>Vomeronasal 2 receptor 42</i>	NM_009493	<i>Vmn2r42</i>	2.221 ± 0.397	0.02369
<i>Vomeronasal 2 receptor 34</i>	NM_001105066	<i>Vmn2r34</i>	2.219 ± 0.522	0.00472
<i>Vomeronasal 2 receptor 33</i>	NM_001105065	<i>Vmn2r33</i>	2.219 ± 0.313	0.00126
<i>RIKEN cDNA 4930444G20 gene</i>	NM_053264	<i>4930444G20Rik</i>	2.207 ± 0.066	0.00105
<i>Predicted gene 5168</i>	NM_001025607	<i>Gm5168</i>	2.190 ± 0.009	0.02598
<i>Olfactory receptor 8</i>	NM_207201	<i>Olfr8</i>	2.178 ± 0.686	0.03600
<i>Olfactory receptor 1287</i>	NM_001011773	<i>Olfr1287</i>	2.160 ± 0.538	0.04949
<i>Slx-like 1</i>	NM_029181	<i>Slxl1</i>	2.149 ± 0.116	0.02176
<i>Prolactin family 3, subfamily d, member 3</i>	NM_172156	<i>Prl3d3</i>	2.146 ± 0.748	0.00696
<i>Vomeronasal 1 receptor 125</i>	NM_001166740	<i>Vmn1r125</i>	2.144 ± 0.195	0.00142

Tabla 18. (Continuación) Genes sobreexpresados en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, identificados mediante *microarrays* de DNA.

Gen	Acceso	Abreviatura	Ratio Exo _{Tol} vs Exo _{Con} ¹	valor p^2
<i>Olfactory receptor 577</i>	NM_147109	<i>Olfr577</i>	2.125 ± 0.507	0.00482
<i>Vomeronasal 2 receptor 93</i>	NM_001104542	<i>Vmn2r93</i>	2.114 ± 0.213	0.00074
<i>Predicted gene 10324</i>	NM_001177832	<i>Gm10324</i>	2.082 ± 0.349	0.00942
<i>Olfactory receptor 360</i>	NM_146622	<i>Olfr360</i>	2.082 ± 0.461	0.00278
<i>Vomeronasal 1 receptor 132</i>	NM_001122682	<i>Vmn1r132</i>	2.069 ± 0.508	0.00447
<i>Vomeronasal 1 receptor 179</i>	NM_207545	<i>Vmn1r179</i>	2.056 ± 0.011	0.00709
<i>Predicted gene 10375</i>	NM_001098269	<i>Gm10375</i>	2.046 ± 0.059	0.00227
<i>Olfactory receptor 591</i>	NM_001011847	<i>Olfr591</i>	2.036 ± 0.219	0.00101
<i>Olfactory receptor 715</i>	NM_146780	<i>Olfr715</i>	2.028 ± 0.245	0.00186
<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12</i>	NM_027144	<i>Arhgef12</i>	2.022 ± 0.745	0.03458
<i>Alpha-takusan pseudogene</i>	NR_033388	<i>Gm3002</i>	2.015 ± 0.186	0.00121
<i>Olfactory receptor 198</i>	NM_001011808	<i>Olfr198</i>	2.004 ± 0.136	0.02978
<i>Olfactory receptor 348</i>	NM_146944	<i>Olfr348</i>	2.001 ± 0.556	0.03882
<i>RIKEN cDNA 3110082D06 gene</i>	NM_028474	<i>3110082D06Rik</i>	1.987 ± 0.143	0.00115
<i>Olfactory receptor 1366</i>	NM_146283	<i>Olfr1366</i>	1.975 ± 0.491	0.00481
<i>Vomeronasal 2 receptor 37</i>	NM_009489	<i>Vmn2r37</i>	1.969 ± 0.225	0.04127
<i>Olfactory receptor 951</i>	NM_001011812	<i>Olfr951</i>	1.964 ± 0.265	0.03386
<i>Olfactory receptor 126</i>	NM_146890	<i>Olfr126</i>	1.961 ± 0.348	0.00774
<i>Sp140 nuclear body protein</i>	NM_001013817	<i>Sp140</i>	1.954 ± 0.600	0.03750
<i>Vomeronasal 2 receptor 51</i>	NM_001105179	<i>Vmn2r51</i>	1.949 ± 0.313	0.00598
<i>Predicted gene 1077</i>	ENSMUST00000103355	<i>Gm1077</i>	1.932 ± 0.234	0.00273
<i>Olfactory receptor 243</i>	NM_001025386	<i>Olfr243</i>	1.926 ± 0.815	0.02959
<i>RIKEN cDNA A530032D15Rik gene</i>	BC094285	<i>A530032D15Rik</i>	1.908 ± 0.461	0.00677
<i>Olfactory receptor 1313</i>	NM_207150	<i>Olfr1313</i>	1.906 ± 0.318	0.04410
<i>Olfactory receptor 539</i>	NM_146961	<i>Olfr539</i>	1.899 ± 0.422	0.00491
<i>Olfactory receptor 1320</i>	NM_207240	<i>Olfr1320</i>	1.892 ± 0.070	0.01747
<i>Olfactory receptor 1419</i>	NM_001011775	<i>Olfr1419</i>	1.886 ± 0.626	0.01413
<i>Olfactory receptor 1184</i>	NM_146823	<i>Olfr1184</i>	1.877 ± 0.427	0.04196
<i>Amylase 2a5</i>	NM_001042711	<i>Amy2a5</i>	1.868 ± 0.067	0.01161
<i>Cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 25</i>	NM_019792	<i>Cyp3a25</i>	1.866 ± 0.008	0.00358

Tabla 18. (Continuación) Genes sobreexpresados en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, identificados mediante *microarrays* de DNA.

Gen	Acceso	Abreviatura	Ratio Exo _{Tol} vs Exo _{Con} ¹	valor <i>p</i> ²
<i>Olfactory receptor 215</i>	NM_146446	<i>Olf215</i>	1.865 ± 0.202	0.00219
<i>Component of Sp100-rs</i>	NM_033616	<i>Csprs</i>	1.864 ± 0.184	0.01611
<i>Membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)</i>	NM_001081287	<i>Mpp7</i>	1.858 ± 0.331	0.00375
<i>Keratin associated protein 31-2</i>	NM_001025244	<i>Krtap31-2</i>	1.856 ± 0.339	0.04904
<i>Eukaryotic translation initiation factor 1A pseudogene</i>	ENSMUST00000095505	<i>Gm16368</i>	1.853 ± 0.140	0.01790
<i>Predicted gene 12794</i>	NM_001085516	<i>Gm12794</i>	1.845 ± 0.131	0.01886
<i>Predicted gene 5662</i>	NM_001013824	<i>Gm5662</i>	1.839 ± 0.064	0.00135
<i>Interferon alpha 2</i>	NM_010503	<i>Ifna2</i>	1.832 ± 0.485	0.02132
<i>Predicted gene 10708</i>	ENSMUST00000098988	<i>Gm10708</i>	1.826 ± 0.287	0.03117
<i>Ribosomal protein L6</i>	NM_011290	<i>Rpl6</i>	1.823 ± 0.582	0.01470
<i>Olfactory receptor 1337</i>	NM_146309	<i>Olf1337</i>	1.819 ± 0.395	0.00837
<i>Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K</i>	NM_001039368	<i>Polr2k</i>	1.818 ± 0.061	0.01402
<i>Keratin associated protein 5-3</i>	NM_023860	<i>Krtap5-3</i>	1.807 ± 0.122	0.00308
<i>Olfactory receptor 1333</i>	NM_207157	<i>Olf1333</i>	1.805 ± 0.468	0.00990

La tabla muestra los 74 mRNAs inducidos (relación ≥ 1.8) en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerizados a Ole e 1, en comparación a los mRNAs de los exosomas derivados de los ratones *naïve*.

¹Los datos corresponden a la media ± SEM de dos experimentos independientes (*n*=40 ratones/condición y experimento).

²Sólo se han considerado los datos con valor de *p* <0.05.

Tabla 19. Genes reprimidos en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, identificados mediante *microarrays* de DNA.

Gen	Acceso	Abreviatura	Ratio Exo _{Tol} vs Exo _{Con} ¹	valor <i>p</i> ²
<i>Predicted gene 10050</i>	ENSMUST00000082239	<i>Gm10050</i>	0.650 ± 0.021	0.03340
<i>SAM pointed domain containing ets transcription factor</i>	NM_013891	<i>Spdef</i>	0.650 ± 0.158	0.02838
<i>SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1</i>	NM_001081037	<i>Srgap1</i>	0.647 ± 0.035	0.00887
<i>Fibroblast growth factor receptor substrate 3</i>	NM_144939	<i>Frs3</i>	0.646 ± 0.048	0.02328
<i>Even skipped homeotic gene 2 homolog</i>	NM_007967	<i>Evx2</i>	0.644 ± 0.201	0.04288
<i>RNA binding motif protein 15B</i>	NM_175402	<i>Rbm15b</i>	0.644 ± 0.162	0.03363
<i>Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)</i>	NM_009464	<i>Ucp3</i>	0.644 ± 0.004	0.01271
<i>Histocompatibility 2, Q region locus 8</i>	NM_023124	<i>H2-Q8</i>	0.641 ± 0.13	0.02096
<i>RIKEN cDNA 2810428I15 gene</i>	BC028495	<i>2810428I15Rik</i>	0.641 ± 0.057	0.02202
<i>RIKEN cDNA 5930403L14 gene</i>	AK141913	<i>5930403L14Rik</i>	0.637 ± 0.011	0.00552
<i>Low density lipoprotein receptor adaptor protein 1</i>	NM_145554	<i>Ldlrap1</i>	0.636 ± 0.028	0.01348
<i>Midkine</i>	NM_010784	<i>Mdk</i>	0.635 ± 0.095	0.03467
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0</i>	NM_029872	<i>Hnrnpa0</i>	0.634 ± 0.032	0.00956
<i>Spectrin beta 1</i>	NM_013675	<i>Spnb1</i>	0.631 ± 0.106	0.01201
<i>ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast)</i>	NM_016860	<i>Actr1a</i>	0.631 ± 0.042	0.00848
<i>Molybdenum cofactor synthesis 3</i>	NM_001160330	<i>Mocs3</i>	0.629 ± 0.031	0.00805
<i>Akirin 1</i>	NM_023423	<i>Akirin1</i>	0.629 ± 0.085	0.02832
<i>RAB34, member of RAS oncogene family</i>	NM_033475	<i>Rab34</i>	0.628 ± 0.085	0.02825
<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10</i>	NM_026684	<i>Ndufb10</i>	0.627 ± 0.047	0.00565
<i>RIKEN cDNA 6030499A19 gene</i>	AK031731	<i>6030499A19Rik</i>	0.624 ± 0.116	0.01697
<i>CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2</i>	NM_001113470	<i>Ctdsp2</i>	0.623 ± 0.020	0.00448
<i>Rab40b, member RAS oncogene family</i>	NM_139147	<i>Rab40b</i>	0.622 ± 0.078	0.01587
<i>Abhydrolase domain containing 5</i>	NM_026179	<i>Abhd5</i>	0.621 ± 0.087	0.01052
<i>Surfeit gene 2</i>	NM_013678	<i>Surf2</i>	0.620 ± 0.090	0.00834
<i>Cullin 1</i>	ENSMUST00000146200	<i>Cul1</i>	0.619 ± 0.142	0.02572
<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 pseudogene</i>	AK142202	<i>Gm13033</i>	0.618 ± 0.048	0.03715
<i>Glutathione S-transferase, pi 1</i>	NM_013541	<i>Gstp1</i>	0.618 ± 0.046	0.03563
<i>Serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)</i>	NM_028230	<i>Shmt2</i>	0.608 ± 0.105	0.01238
<i>COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 6 (Arabidopsis thaliana)</i>	NM_012002	<i>Cops6</i>	0.605 ± 0.008	0.03460

Tabla 19. (Continuación) Genes reprimidos en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, identificados mediante *microarrays* de DNA.

Gen	Acceso	Abreviatura	Ratio Exo_{Tol} vs Exo_{Con}¹	valor <i>p</i>²
<i>RIKEN cDNA 1700008J07 gene</i>	NR_024331	<i>1700008J07Rik</i>	0.604 ± 0.047	0.00402
<i>Uridine-cytidine kinase 2</i>	NM_030724	<i>Uck2</i>	0.594 ± 0.056	0.00711
<i>Sprouty-related, EVH1 domain containing 2</i>	BC040462	<i>Spred2</i>	0.593 ± 0.068	0.01162
<i>RIKEN cDNA 1110006G14 gene</i>	ENSMUST00000032900	<i>1110006G14Rik</i>	0.592 ± 0.093	0.04644
<i>Expressed sequence AA386476</i>	ENSMUST00000098781	<i>AA386476</i>	0.589 ± 0.199	0.02784
<i>Hepcidin antimicrobial peptide 2</i>	NM_183257	<i>Hamp2</i>	0.583 ± 0.091	0.00616
<i>Microfibrillar-associated protein 3-like</i>	NM_027756	<i>Mfap3l</i>	0.571 ± 0.051	0.00654
<i>Pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 3</i>	NM_031256	<i>Plekha3</i>	0.569 ± 0.219	0.03066
<i>RIKEN cDNA 1810022K09 gene</i>	BC115807	<i>1810022K09Rik</i>	0.552 ± 0.046	0.01746
<i>Brain protein I3</i>	NM_018772	<i>Bri3</i>	0.549 ± 0.228	0.03630
<i>ADP-ribosylation factor 6</i>	ENSMUST00000050063	<i>Arf6</i>	0.531 ± 0.067	0.00215
<i>Histone cluster 1, H4c</i>	NM_178208	<i>Hist1h4c</i>	0.511 ± 0.241	0.02951
<i>Signal recognition particle receptor ('docking protein')</i>	NM_026130	<i>Srpr</i>	0.504 ± 0.055	0.00190
<i>Small nucleolar RNA, C/D box 49B</i>	NR_028526	<i>Snord49b</i>	0.433 ± 0.122	0.02089

La tabla muestra los 43 mRNAs reprimidos (relación ≤ 0.65) en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerizados a Ole e 1, en comparación a los mRNAs de los exosomas derivados de los ratones *naïve*.

¹Los datos corresponden a la media ± SEM de dos experimentos independientes ($n=40$ ratones/condición y experimento).

²Sólo se han considerado los datos con valor de $p < 0.05$.

Muchos de los genes sobreexpresados codificaban para proteínas de función conocida. Así, por ejemplo, entre los genes sobreexpresados, 21 codificaban para receptores olfativos (*Olfir*) y 19 para receptores vomeronasales tipo 1 (*Vmn1r*) y 2 (*Vmn2r*). Algunos de estos genes han sido previamente detectados en exosomas derivados de una línea de mastocitos de ratón [Valadi *et al.*, 2007], así como de una línea de adenocarcinoma pancreático de rata [Nazarenko *et al.*, 2010]. Además, también se han detectado varios miembros de la familia de receptores olfativos en exosomas derivados de orina en humanos [Gonzales *et al.*, 2009]. Los *Olfir* y *Vmnr* forman parte del sistema olfativo y del órgano vomeronasal (VNO), respectivamente: los dos órganos que detectan estímulos olfativos en mamíferos [Dulac & Torello, 2003; Brennan & Zufall, 2006]. Los *Olfir* pertenecen a una gran familia de proteínas transmembrana integrada por más de 1.000 miembros, que son expresados por las neuronas sensoriales olfatorias localizadas en el epitelio olfatorio [Buck & Axel, 1991]. Estos receptores detectan moléculas odorantes en el ambiente que revelan fuentes de alimentos o sustancias tóxicas, la presencia de depredadores y comportamientos sociales y sexuales. VNO es un órgano quimiorreceptor que detecta específicamente feromonas que inducen una serie de comportamientos sociales innatos, tales como el apareamiento y la agresión. Las feromonas son reconocidas por 2 familias de receptores acoplados a proteína G, denominadas *Vmn1r* y *Vmn2r*, incluyendo cada una más de 100 miembros [Dulac & Torello, 2003; Shi & Zhang, 2007]. Los *Vmnr* se expresan en las neuronas sensoriales del VNO [Michaloski *et al.*, 2011]. Las neuronas vomeronasales también expresan una tercera familia multigénica que codifica para moléculas MHC-Ib no clásicas -conocidas como H2-Mv o M10- cuya función se desconoce [Ishii *et al.*, 2003; Loconto *et al.*, 2003], aunque no se puede descartar que participen en la respuesta inmune [Ishii & Mombaerts, 2008]. Estos H2-Mv son co-expresados de forma combinada con la superfamilia *Vmn2r* [Loconto *et al.*, 2003]. Diversos estudios han demostrado que los *Vmn2r* de las neuronas vomeronasales también pueden detectar péptidos que son ligandos de moléculas MHC-I [Boehm & Zufall, 2006; Leinders-Zufall *et al.*, 2009]. Una posible explicación de la presencia de los transcritos *Olfir* y *Vmnr* en los exosomas sería que las neuronas sensoriales olfatorias y vomeronasales - que se encuentran en contacto con el medio exterior- respondan frente al antígeno para regular la respuesta inmune y liberen exosomas que alcanzarían el BALF. No obstante, la expresión de genes *Olfir* y *Vmn1r* ha sido descrita en otros tejidos no olfatorios, principalmente en testículos [Parmentier *et al.*, 1992; Vanderhaeghen *et al.*, 1997; Spehr *et al.*, 2003], pero también en corazón, cerebro, hígado, músculo y pulmón [Mombaerts, 1999; Young & Trask, 2002]. Por lo tanto, es posible que algunos de estos genes de receptores se expresen en un pequeño número de células en el pulmón, donde desempeñarían una función no olfativa, sino como mecanismo de defensa inmunológico, al ser receptores acoplados a proteína G.

Otros de los genes sobreexpresados codifican: enzimas, como la α -amilasa (*Amy2a5*) que cataliza la hidrólisis de las uniones $\alpha(1-4)$ del almidón y del glucógeno y la RNA polimerasa II (*Polr2k*); proteínas de la familia del citocromo P450 (*Cyp3a25*); citoquinas como el interferón- $\alpha 2$ (*Ifna2*), producido por macrófagos, que presenta actividad antiviral; y hormonas como la prolactina (*Pr13d1* y *Pr13d3*). Por otra parte, el análisis de las secuencias de los genes *Gm10375*, *3110082D06Rik* y *Gm12794* revelaba su correspondencia con una guanilato-quinasa asociada a membrana (MAGUK), una proteína de membrana y una proteína homóloga a las proteínas Pramel (*Preferentially expressed antigen in melanoma-like*), respectivamente.

En relación con los genes reprimidos, sólo 3 de los 43 genes han sido descritos previamente en exosomas, en concreto los derivados de mastocitos de ratón: el factor de ADP-ribosilación 6 (*Arf6*), la plectrina 3 (*Plekha3*) y la proteína H2 de MHC-I (*H2-Q8*) [Valadi *et al.*, 2007]. Sin embargo, sí se han detectado las proteínas codificadas por alguno de los genes reprimidos en exosomas de otras fuentes, entre ellos podemos mencionar los productos génicos de *Rab34* -miembro de la familia de proteínas Ras-, el *cluster* 1 de la histona H4c que codifica para la proteína H4 (*Hist1h4c*), la subunidad 6 del signalosoma COP9 (*Cops6*), la serín-hidroximetil transferasa 2 (*Shmt2*), la glutatión S-transferasa -GST- (*Gstp1*) y la espectrina- β 1 (*Spnb1*) [Mathivanan *et al.*, 2012]. En términos generales, los genes reprimidos codifican para proteínas con funciones muy diversas, en comparación con los genes sobreexpresados, donde un elevado porcentaje codifican para receptores acoplados a proteínas G.

Varios de los genes reprimidos codifican para enzimas, tales como la GST (*Gstp1*), la serín-hidroximetil transferasa 2 (*Shmt2*), la acilglicerol-3-fosfato-O-aciltransferasa (*Abhd5*), y pequeñas GTPasas -como *Rab34* (*Rab34*) o *Rab40b* (*Rab40b*)-, la subunidad de la NADH-deshidrogenasa (complejo I) de la cadena respiratoria mitocondrial (*Ndufb10*) -complejo enzimático que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona [Murray *et al.*, 2003]- y la plectrina 3 (*Plekha3*) -serín/treonín-quinasa que une específicamente fosfatidilinositol-4-fosfato-. *Gstp1* cataliza la conjugación del glutatión reducido con un amplio número de electrófilos hidrofóbicos, tanto exógenos como endógenos [Mannervik *et al.*, 1985; Kano *et al.*, 1987]. Además, participa en numerosos procesos biológicos tales como la respuesta celular a lipopolisacáridos, la proliferación celular de un progenitor mieloide común, de fibroblastos y de leucocitos, y la producción de IL-1 β y TNF. *Abhd5* cataliza la conversión del lisofosfatidato en fosfatidato, moléculas clave para la síntesis de los triglicéridos, los fosfolípidos y los glucolípidos [Lass *et al.*, 2006; Akiyama *et al.*, 2008; Ghosh *et al.*, 2008].

Entre los genes reprimidos también hay factores de transcripción como *Evx2* y *Spdef*, moléculas del sistema inmune como el gen *H2-Q8* -que codifica para la proteína H2 de MHC-I, implicada en el procesamiento de antígenos y en la presentación de los péptidos en la respuesta inmune [Devlin *et al.*, 1985]- y la hepcidina (*Hamp2*). La hepcidina es un péptido rico en cisteínas que juega un papel central en la regulación de la homeostasis de hierro [Lou *et al.*, 2004], así como en la respuesta inmune innata a través de su actividad antimicrobiana [Zasloff, 2002]. Se ha demostrado que las células del epitelio respiratorio [Frazier *et al.*, 2011] y los macrófagos alveolares [Nguyen *et al.*, 2006] expresan este péptido en respuesta a citoquinas inflamatorias. Por otra parte, el gen *Srgap1* codifica para una proteína que activa las GTPasas Rho y Cdc42 [Wong *et al.*, 2001]. *Srgap1* participa en varios procesos biológicos como el crecimiento del axón, la migración celular, la transducción de señales mediada Rho y otras pequeñas GTPasas. La midquina es un factor de crecimiento codificado por el gen *Mdk*, que presenta capacidad de unir heparina y promover el crecimiento. Esta proteína está implicada en la formación de la neoíntima tras el daño arterial, posiblemente mediando el reclutamiento de leucocitos [Weckbach *et al.*, 2012]. El gen *Mfap3* codifica para una proteína asociada a microfibrillas. El gen *Ldlrap1* corresponde a una proteína adaptadora del receptor de las lipoproteínas de baja densidad. El gen *Rbm15b* codifica para una proteína que une RNA de tamaño grande, regulando la eliminación de secuencias internas alternativas. Finalmente, el gen *Ucp3* corresponde a la termogenina, un canal iónico que actúa como desacoplante de la fosforilación oxidativa [Jia *et al.*, 2009]. Además, participa en la termogénesis, la regulación de la respiración tisular y de la producción de ATP y, de esta manera, del metabolismo basal.

El inconveniente de los estudios con *microarrays* es que son capaces de generar largas listas de genes diferencialmente expresados, pero proporcionan pocas pistas sobre cuál de esos cambios es suficientemente importante, desde el punto de vista biológico, para condicionar un fenotipo determinado. Sin embargo, tienen la ventaja de proporcionar una imagen general de patrones de expresión.

Con el fin de analizar las relaciones funcionales en el conjunto de genes expresados diferencialmente en los Exo_{Tol} del BALF, se utilizó el *software STRING*. De los 117 genes expresados diferencialmente en los Exo_{Tol}, 38 no mostraron ninguna entrada en la base de datos *STRING*, en 35 el *software* no encontró interacciones de alta confianza -por lo que se omitieron- y sólo 45 permitieron obtener una red de interacción. La **Figura 32** muestra la red de interacción entre las proteínas/genes expresados diferencialmente en los Exo_{Tol}. El análisis realizado con el *software STRING* resultó en un total de 6 *clusters* de interacción entre proteínas/genes asociados, con el valor más alto de confianza (0.9). Los *clusters* fueron analizados según los términos y las anotaciones del consorcio GO [Ashburner *et al.*, 2000].

El **cluster 1**, asociado a señales de transducción olfativas, está constituido por 9 receptores olfatorios acoplados a proteína G: *Olf126*, *Olf198*, *Olf243*, *Olf577*, *Olf715*, *Olf951*, *Olf1287*, *Olf1320* y *Olf1366*. Todos ellos se encuentran sobreexpresados en los Exo_{Tol}. El análisis GO indica que el proceso biológico asociado con este *cluster* es la ruta de señalización de receptores acoplados a proteína G.

El **cluster 2**, que gira en torno a dos nodos basados en *Cul1* y *Ctdsp2*, está integrado por 7 genes, de los cuales 5 se encontraban sobreexpresados (*Cul1*, *Ctdsp2*, *Cops6*, *Uck2* y *Srpr*) y 2 reprimidos (*Polr2k* y *Rpl6*). La culina 1 (*Cul1*) es un componente del complejo proteico ubiquitin-ligasa E3 que media la ubiquitinación de una multitud de proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular, la transducción de señales y la transcripción [Glickman & Ciechanover, 2002]. *Cul1* contribuye a la actividad catalítica del complejo mediando el posicionamiento del sustrato y la enzima. *Uck2* es la uridín-quinasa, implicada en la proliferación celular y en la supervivencia [Greengard *et al.*, 1980]. *Cops6* es una de las 8 subunidades del signalosoma COP9, un complejo proteico altamente conservado que actúa como regulador positivo de la ubiquitin-ligasa E3, con la que interacciona [Schwechheimer *et al.*, 2001; Groisman *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2003]. Bioquímicamente, este complejo está asociado con 3 actividades: fosforilación, desnedilación y desubiquitinación [Cope & Deshaies, 2003; Wolf *et al.*, 2003]. COP9 actúa como un importante regulador de varios procesos celulares a través de la vía ubiquitina/proteasoma. Esta vía juega un papel central en la degradación de proteínas reguladoras de vida corta, implicadas en una amplia serie de eventos celulares, tales como la regulación del ciclo celular, la modulación de receptores de superficie y canales iónicos, la activación de factores de transcripción, el procesamiento y la presentación de antígenos, así como otros aspectos de la respuesta inmune [Schwechheimer & Deng, 2004; da Silva Correia *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2011]. *Ctdps2* corresponde a la proteín-fosfatasa 2 pequeña que cataliza la desfosforilación de la serina 5' dentro de la repetición en tándem de 7 residuos en el dominio C-terminal de la subunidad Polr2a de la RNA polimerasa II. En la red, *Ctdsp2* interacciona con la subunidad Polr2k de la RNA polimerasa II dependiente de DNA, cuyos productos son transcritos nucleares de alto peso molecular, de los cuales se obtienen posteriormente los mRNAs, así como los precursores de los RNAs nucleares pequeños [Shpakovski *et al.*, 1995]. También es un componente de la RNA polimerasa I y III. A su vez, Polr2k

interacciona con la proteína ribosomal L6 (Rpl6), un componente estructural de la subunidad 60s del ribosoma, un complejo de proteína-rRNA esencial en la biosíntesis de proteínas [Odintsova *et al.*, 2003]. Rpl6 tiene capacidad de unir DNA y RNA [Zaman, 1993]. Además, el análisis GO reveló que Rpl6 participa en la regulación de la transcripción dependiente de DNA, la transcripción viral, la traducción (iniciación, elongación y terminación) y el direccionamiento co-traducciona dependiente de Srp (*Signal recognition particle*) de proteínas a membrana. En el caso de Ctdsp2, ésta interacciona también con Srpr, el receptor de Srp. Se trata de un complejo proteína-RNA que actúa como receptor de la secuencia señal del retículo endoplasmático [Halic *et al.*, 2006; Schlenker *et al.*, 2006]. Srpr, junto con Srp, asegura el correcto direccionamiento de las proteínas de secreción, a la membrana del retículo endoplasmático, durante su traducción [Schlenker *et al.*, 2006]. En conclusión, el *cluster 2* está relacionado, principalmente, con proteínas que participan en la biosíntesis, transporte y recambio de proteínas. En este *cluster*, 3 proteínas -Cul1, Rpl6 y Uck2- comparten patrones de interacción con proteínas involucradas en otros agrupamientos. Así, Cul1 interacciona con las proteínas Mocs3 y Cops6. Mocs3 es una enzima esencial en la biosíntesis del cofactor de molibdeno así como en la 2-tiolación de Lys-tRNA, Glu-tRNA y Gln-tRNA [Chowdhury *et al.*, 2012]. Además, Mocs3 interacciona con la proteasa 4 específica de SUMO-1 (*4930444G2Rik*), perteneciente a la familia de proteasas Ulp1. Por otra parte, Uck2 interacciona con las proteínas Arf6, Spnb1 y Spred2 del *cluster 6*, que se comentarán más adelante.

El *cluster 3* está formado por los genes *Cops6*, *Actr1a* y *Hist1h4c* que están reprimidos en los Exo_{Tol}. *Actr1a* codifica para la α -contractina, una proteína homóloga a la actina que se encuentra asociada al centrosoma [Clark & Meyer, 1992; Lees-Miller *et al.*, 1992]. La α -contractina forma parte de la dinactina, complejo proteico implicado en la mayoría de las actividades de la dineína citosólica y la cinesina II, en eucariotas, tales como el transporte intracelular bidireccional a lo largo de los microtúbulos [Schroer, 2004]. La dinactina contribuye significativamente a la organización del citoesqueleto y la motilidad subcelular en todas las fases del ciclo celular [Karki & Holzbaur, 1999; Schroer, 2004]. La α -contractina forma un polímero corto que se asocia a dos proteínas que unen actina: CapZ [Schafer *et al.*, 1994] y la espectrina $\beta 1$ (Spnb1) [Holleran *et al.*, 2001]. La interacción de la α -contractina con la espectrina $\beta 1$ (presente en el *cluster 6*) debe representar un mecanismo general por el cual la dinactina se une a una variedad de estructuras subcelulares. *Hist1h4c* es el gen que codifica para la histona H4, con diferentes funciones celulares, como ya se ha comentado con anterioridad. Las interacciones entre Cops6, Actr1a y Hist1h4c eran esperadas.

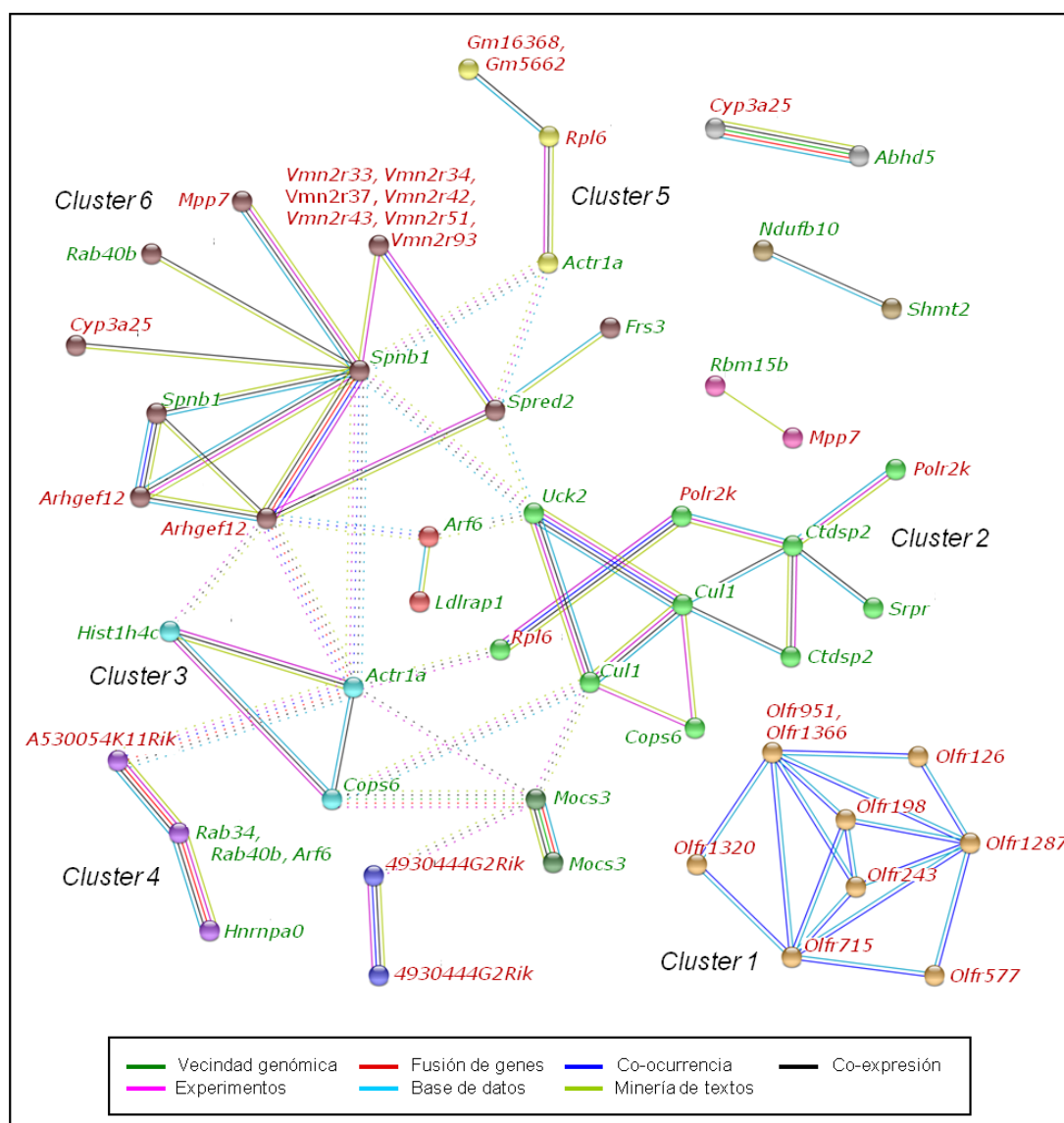


Figura 32. Red de interacción entre los genes expresados diferencialmente en los Exo_{TOL}. Representación gráfica de la interacción y agrupamiento en *clusters* de las proteínas/genes desregulados, observados mediante *microarrays* de DNA, utilizando el programa de visualización de redes *STRING*. Los nodos del gráfico representan las proteínas/genes, mientras que los enlaces que unen los distintos nodos indican las relaciones existentes entre ellos, señaladas en la leyenda. Se omitieron los nodos que no presentaban ninguna conexión. En rojo se indican los genes sobreexpresados y en verde, los reprimidos. El conjunto de datos se limita al organismo *Mus musculus*. El score de confianza aplicado fue 0.9 (valor de confianza más alto).

Los genes que codifican para las proteínas Rab34, Rab40b y Arf6 constituyen el nodo base del **cluster 4**. Estas 3 proteínas pertenecen a la superfamilia Ras y proteínas monoméricas con actividad GTPasa. Estas proteínas actúan como interruptores moleculares de una gran variedad de procesos biológicos críticos, como el control del ciclo celular, la supervivencia y la muerte celular, la diferenciación, el desarrollo y el crecimiento [Wennerberg *et al.*, 2005]. Rab34 y Rab40b son miembros de la subfamilia Rab, mientras que Arf6 pertenece a la subfamilia Arf. La subfamilia Rab está implicada en casi todos los aspectos del transporte de vesículas: el movimiento, la dirección y la fusión [Zerial & McBride, 2001]. Así, Rab34 está asociada con el transporte de proteínas a través del

aparato de Golgi y con la redistribución de los lisosomas en la región *peri*-Golgi [Goldenberg *et al.*, 2007]. Rab40b interacciona con la elongina B/C y la culina 5, en el aparato de Golgi, para formar el complejo ubiquitin-ligasa E3 tipo ECS (Elongina-Culina-proteína con caja SOCS), actuando como regulador de la vía de señalización no canónica Wnt [Lievens *et al.*, 2008]. Arf6 es el factor 6 de ADP-ribosilación y presenta varias funciones celulares que están frecuentemente implicadas en el tráfico de membranas biológicas y de proteínas transmembrana [Donaldson, 2003; D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006]. Arf6 está específicamente implicado en la endocitosis de proteínas de membrana y, en menor medida, en su reciclaje. Arf6 afecta a la actividad de enzimas que modifican lípidos, como la fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato-quinasa y la fosfolipasa D que participa en la regulación de la estructura y función de las membranas [Doherty & McMahon, 2009]. También participa en la regulación del citoesqueleto de actina y funciona como una molécula reguladora de la fagocitosis mediada por el receptor Fcy. Estas tres proteínas interactúan con Hnrnpa0 y A530054K11Rik. Hnrnpa0, es la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A0 que es codificada por el gen *Hnrnpa0* y está implicada en la regulación post-transcripcional de los mRNAs de citoquinas [Reinhardt *et al.*, 2010]. Según la anotación GO, Hnrnpa0 está implicada en otros procesos biológicos, como la estabilización del mRNA mediada por 3'-UTR, la eliminación de secuencias internas alternativas del mRNA, la respuesta inflamatoria y a lipopolisacáridos.

La proteína Rpl6 es el nodo central del **cluster 5**, integrado por la Actr1a, así como por 2 factores de iniciación de la traducción, Gm16368 y Gm5662, requeridos en la biosíntesis de proteínas. Este *cluster* de proteínas parece estar asociado, también, con la biosíntesis de proteínas.

Finalmente, el **cluster 6** con 3 nodos centrales -*Arhgef12*, *Spnb1* y *Spred2*- y un total de 14 genes, es el agrupamiento más grande observado. Está formado por 10 proteínas (Arhgef12, Cyp3a25, Mpp7 y Vmn2r33, 34, 37, 42, 43, 51 y 93) con transcritos sobreexpresados y 4 proteínas (Frs3, Rab40, Spnb1 y Spred2) con transcritos reprimidos. Spnb1, la espectrina β 1, interacciona con las proteínas Arhgef12, Cyp3a25, Mpp7, Rab40b y varios Vmn2r, cuya función ya se comentó anteriormente. Arhgef12 es el factor intercambiador de nucleótidos de guanina 12 de las GTPasas Rho, Rac y Cdc42. Entre los eventos biológicos importantes asociados a Arhgef12 están la contracción de la musculatura lisa, la guía del axón y la regulación del citoesqueleto de actina. Cyp3a25 forma parte de la familia de citocromos P450 que constituyen un grupo de monooxigenasas con un grupo hemo como coenzima redox activa. En los microsomas del hígado, estas enzimas intervienen en los procesos de biotransformación, catalizando casi todas las reacciones de oxidación [Down *et al.*, 2006]. Estas monooxigenasas pueden ser inducidas en el hígado y otros tejidos como consecuencia de la exposición a sustancias extrañas como fármacos, pesticidas y carcinógenos [Zanger *et al.*, 2013]. Por otra parte, la proteína Mpp7 es una guanilato-quinasa de membrana que actúa como un importante adaptador que promueve la polarización de las células epiteliales y la formación de uniones estrechas [Katoh & Katoh, 2004; Stucke *et al.*, 2007]. Mpp7 también exhibe actividad serín-quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina. La proteína transductora de señales Spred2 también interacciona con los Vmnr al igual que Spnb1. Spred2 es sustrato de la tirosín-quinasa, la cual inhibe la activación de MAPK mediada por factores de crecimiento. Spred2 participa en la vía de señalización Jak-STAT que juega una función central en la transducción de señales de citoquinas [Yoshimura, 2009; Cokic *et al.*, 2012]. Igualmente, Spred2 interacciona con las proteínas Frs3 y Arhgef12. Frs3 es el sustrato del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos. Se trata de una

proteína adaptadora que une los receptores FGFR y NGFR a las vías de transducción de señales *downstream* [Xu *et al.*, 1998]. Además, está implicada en la activación de MAPK [Gotoh *et al.*, 2004] e inhibe la vía de señalización ERK2 [Huang *et al.*, 2004]. Finalmente, Arhgef12, Spnb1 y Spred2 establecen interacciones con proteínas que pertenecen a otros *clusters*: Actr1a y Ukc2. A modo de conclusión, este agrupamiento presenta un conjunto de proteínas implicadas en vías de transducción de señales en el interior de la célula y la regulación del citoesqueleto de actina que, como se ha demostrado, juega un importante papel en la señalización celular.

El análisis de la red de interacciones entre proteínas/genes llevado a cabo en la presente tesis, pone de manifiesto la alteración de varios procesos biológicos como consecuencia de la inducción de tolerancia a Ole e 1. Dichos procesos no son independientes, sino que están conectados entre sí generando un sistema capaz de modificarse en respuesta a diferentes condiciones fisiopatológicas.

A pesar de sus limitaciones, la red de interacción entre proteínas/genes generada a partir de los genes expresados diferencialmente en los Exo_{Tol} nos permite proponer un conjunto de 5 proteínas (genes) a estudiar, como posibles moléculas vinculadas a las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol}: Actr1a, Arf6, Arhgef12, Spnb1 y Spred2. Estas proteínas aparecen en los *clusters* asociados, fundamentalmente, con la regulación del citoesqueleto de actina (Actr1a y Arhgef12), la transducción de señales (Spnb1 y Spred2) y el tráfico de membranas (Arf6).

Análisis de microRNAs

El electroferograma de RNA total confirmó que los exosomas derivados del BALF de ratón contienen grandes cantidades de sRNAs (**Figura 30**). Estos datos sugerían la posible presencia de miRNAs entre las especies de sRNAs, al igual que ha sido descrito previamente en numerosos estudios para exosomas derivados de otras fuentes [Valadi *et al.*, 2007; Hunter *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2008; Skog *et al.*, 2008; Gibbings *et al.*, 2009; Pegtel *et al.*, 2010; Eldh *et al.*, 2010; Ohshima *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010b]. El hecho de que los miRNAs -al igual que los factores de transcripción- sean elementos reguladores clave de la expresión de genes implicados en diferentes procesos biológicos, nos llevó a pensar que también podrían contribuir al efecto inmunosupresor de los Exo_{Tol} frente a la sensibilización alérgica en nuestro modelo animal. Por ello, nos propusimos estudiar el patrón de expresión diferencial de miRNAs en los Exo_{Tol} en relación con los Exo_{Con}. De esta forma, un nuevo enfoque en el estudio de inducción de tolerancia en el que se tengan en cuenta los miRNAs, podría contribuir a un mejor conocimiento de este proceso, además de tener una gran importancia como posibles biomarcadores y dianas terapéuticas.

El descubrimiento de los miRNAs se considera como uno de los hitos más importantes en las últimas décadas. El primer miRNA (miRNA *lin-4*) fue descrito en 1.993 por el grupo del Dr. Ambros, al observar que el gen *lin-4* no codificaba para una proteína, sino que producía un sRNA de 22 nucleótidos que actuaba como regulador negativo del gen *lin-14*, necesario en el control temporal del desarrollo larvario del nemátodo *Caenorhabditis elegans* [Lee *et al.*, 1993]. El término **microRNA** fue acuñado en 2.001, cuando se descubrieron un gran número de sRNAs potencialmente implicados en la regulación génica [Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee & Ambros, 2001]. Desde entonces, se han

identificado 18.226 precursores de miRNAs, que dan lugar a 21.643 miRNAs maduros en 168 especies distintas (*miRBase release 18.0*, <http://www.mir.base>) [Kozomara & Griffiths-Jones, 2011].

Los miRNAs constituyen una familia de sRNAs monocatenarios no codificantes, con una longitud entre 19 y 25 nucleótidos, que regulan la expresión de genes codificantes de proteínas a nivel postranscripcional, de una manera específica de secuencia [Ambros & Lee, 2004]. Estos sRNAs ejercen su acción reguladora a través de su unión a secuencias complementarias específicas de la región 3'-UTR de sus mRNAs diana, promoviendo su degradación o inhibiendo su traducción de modo coordinado [He & Hannon, 2004]. La inducción de la transcripción génica por miRNAs también se ha publicado, aunque en menor extensión [Vasudevan *et al.*, 2007]. De esta forma, los miRNAs permiten regular los niveles de proteína en un momento dado y/o en un tipo celular particular [Krol *et al.*, 2010].

Diversos estudios han demostrado que los miRNAs participan en la regulación de numerosos eventos biológicos -el desarrollo, la proliferación, la apoptosis, la respuesta inmune y la replicación viral, entre otros- y que cambios en sus patrones de expresión están asociados con muchas enfermedades humanas, como cáncer, diabetes mellitus e infecciones virales, por mencionar algunas. Además, un único miRNA podría, potencialmente, regular cientos de mRNAs diana en una célula e, igualmente, cada mRNA diana puede ser regulado por varios miRNAs, dependiendo del número de elementos de reconocimiento (MREs) que presente. En el caso de mamíferos se predice que, aproximadamente, entre el 20% y el 30% de los genes codificantes de proteínas del genoma están regulados por miRNAs [Lewis *et al.*, 2005]. Así, cualquier cambio en el patrón de miRNAs podría conllevar importantes alteraciones en el fenotipo de la célula, como la inducción del estado de tolerancia frente a un antígeno.

El análisis con *microarrays* permitió identificar un total de 323 genes que codifican para miRNAs, de los cuales sólo 14 mostraron una expresión diferencial en los exosomas del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, comparados con los ratones *naïve* ($p < 0.05$) (**Tabla 20**). Entre estos, 10 estaban sobreexpresados (*miR-218-1*, *miR-107*, *miR-505*, *miR-7b*, *miR-103-2*, *miR-15a*, *miR-224*, *miR-592*, *miR-181b-1* y *miR-672*) y 4 se encontraban reprimidos (*miR-375*, *miR-187*, *miR-320* y *miR-99b*). Para los estudios de expresión diferencial de miRNAs en exosomas derivados de fluidos complejos como el BALF, el cambio de expresión se fijó en 1.2 veces por considerarse más apropiado para identificar desregulaciones que afecten sólo a subpoblaciones de células.

De los 14 miRNAs diferencialmente expresados en los Exo_{Tol}, 3 se encuentran localizados en el cromosoma X: *miR-505*, *miR-224* y *miR-672*, todos ellos sobreexpresados en los Exo_{Tol}. Mientras que en el cromosomas 17 se encuentra un par de miRNAs: uno de ellos sobreexpresado, *miR-7b*, y el otro reprimido, *miR-99b*. Esta misma situación se repite con los pares: *miR-15a* (sobreexpresado) y *miR-320* (reprimido), colocalizados en el cromosoma 14 y *miR-181b-1* (sobreexpresado) y *miR-375* (reprimido), en el cromosoma 1. Estos datos sugieren que la colocalización física de ciertos miRNAs en un mismo cromosoma podría estar relacionada con su papel regulador de la transcripción, como han sugerido ciertos autores [Croce, 2009].

A excepción de *miR-592* y *miR-672*, el resto de los miRNAs cuya expresión se ve modificada, han sido descritos previamente en exosomas [Mathivanan & Simpson, 2009; Mathivanan *et al.*, 2010; Mathivanan *et al.*, 2012]. Aunque se ha discutido mucho sobre el potencial que tienen los miRNAs presentes en los exosomas como biomarcadores, todavía existe una pregunta muy importante por resolver: se sabe que los miRNAs reflejan la actividad celular, pero ¿cuál es su función biológica?

Tabla 20. miRNAs expresados diferencialmente en los exosomas tolerogénicos derivados del BALF.

microRNA	Nº de acceso GeneBank	Ratio ¹	valor <i>p</i> ²	Cromosoma	Nº de dianas potenciales ³
miR-218-1	NR_029798	1.988 ± 0.274	0.00729	5	613
miR-107	NR_029783	1.961 ± 0.138	0.00282	19	360
miR-505	NR_030499	1.675 ± 0.217	0.00571	X	115
miR-7b	NR_029827	1.553 ± 0.048	0.02929	17	246
miR-103-2	NR_029755	1.445 ± 0.041	0.01175	2	360
miR-15a	NR_029733	1.407 ± 0.170	0.03151	14	821
miR-224	NR_029808	1.378 ± 0.119	0.04379	X	232
miR-592	NR_030420	1.373 ± 0.082	0.02346	6	121
miR-181b-1	NR_029820	1.312 ± 0.050	0.04857	1	731
miR-672	NR_030430	1.286 ± 0.024	0.04594	X	100
miR-375	NR_029876	0.703 ± 0.104	0.03231	1	122
miR-187	NR_029573	0.653 ± 0.063	0.01550	18	4
miR-320	NR_029802	0.642 ± 0.072	0.02547	14	432
miR-99b	NR_029536	0.586 ± 0.195	0.02622	17	36

¹En rojo, se muestran los miRNAs sobreexpresados y en verde, los miRNAs reprimidos en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1 en comparación con los derivados de ratones *naïve*. Los datos corresponden a la media ± SEM de dos experimentos independientes (*n* = 40 ratones/condición y experimento).

²El valor *p* se calculó mediante el test-*t* de Student (*p* < 0.05).

³La búsqueda de potenciales mRNAs diana se realizó con el programa *TargetScan*.

El miR-218-1, que se sobreexpresa en los Exo_{Tol}, está reprimido en la reacción inflamatoria en un modelo múdo de asma, con un incremento concomitante de los receptores de TNF- α [Garbacki *et al.*, 2011]. Una de sus dianas validada experimentalmente, en células humanas del epitelio bronquial, es el mRNA que codifica para el factor de transcripción MAFG (*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G*) [Schembri *et al.*, 2009]. Los resultados indican que miR-218-1 modula la expresión génica en el epitelio respiratorio en respuesta al humo del tabaco y otros agentes ambientales. Los niveles de expresión de miR-218-1 también disminuyen en ciertos tipos de cáncer, como el nasofaríngeo, el de boca o el de vejiga [Alajez *et al.*, 2011; Uesugi *et al.*, 2011; Vergoulis *et al.*, 2012].

Los miR-103-2 y miR-107, pertenecientes a la misma familia de miRNAs, se asocian con varios tipos de cánceres, como el gástrico o el colorrectal [Yamakuchi *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2012]. Además, los niveles de expresión de estos dos miRNAs se encuentran incrementados en ratones obesos, al controlar la expresión de caveolina-1, un regulador positivo de la homeostasis de la glucosa por su interacción con el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) y el receptor de la insulina [Trajkovski *et al.*, 2011].

El miR-375 es otro regulador clave de la homeostasis de la glucosa que se expresa en páncreas y cerebro [Baroukh & Van Obberghen, 2009]. Varios estudios han demostrado que su expresión se encuentra reprimida en pacientes con enfermedades tipo Th2, como colitis ulcerosa [Wu *et al.*, 2008], dermatitis atópica [Sonkoly *et al.*, 2010] y esofagitis eosinofílica [Lu *et al.*, 2012]. Existe correlación inversa entre los niveles de expresión de miR-375 y el grado de inflamación alérgica. Las células epiteliales representan el tipo celular implicado en la inflamación alérgica que exhibe los niveles de expresión más altos de miR-375. Además, miR-375 es el único miRNA reprimido en células humanas de los epitelios bronquial y esofágico, tras la estimulación con IL-13 [Lu *et al.*, 2012]. Esta citoquina

desempeña un papel central en las enfermedades alérgicas, siendo una de sus funciones críticas modificar la expresión génica de las células epiteliales *in vivo* e *in vitro* [Lee *et al.*, 2001; Woodruff *et al.*, 2007; Lu *et al.* 2012]. En conjunto, estos estudios sugieren que miR-375 podría, potencialmente, reprimir los efectos mediados por IL-13 -posible diana terapéutica para el tratamiento de las enfermedades alérgicas [Corren, 2011]-.

El miR-505 presenta propiedades antioncogénicas, al inhibir *in vitro*, la proliferación de las células tumorales de cáncer de mama, induciendo su apoptosis [Yamamoto *et al.*, 2011]. En este estudio, los autores encontraron que los niveles de expresión de miR-505 se correlacionan directamente con la expresión de la serín/treonín-quinasa Akt3, enzima que juega un papel crítico en el control de la relación supervivencia/apoptosis.

El miR-7b es otro miRNA sobreexpresado en los Exo_{Tol} con efecto antioncogénico. Este miRNA regula negativamente la expresión de factor de transcripción Yin Yang-1 que estimula el crecimiento de tumores en el cáncer de colon, a través de la vía de señalización Wnt [Zhang *et al.*, 2012a]. También inhibe la tumorigénesis al regular eficientemente la vía de señalización PI3K/Akt, actuando sobre la expresión de 3 quinasas: la proteína ribosomal S6 quinasa (p70S6K), la fosfatidil inositol-3-fosfatocinasa (PI3K) y la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) [Fang *et al.*, 2012].

El miR-15a juega un papel muy importante en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis a través de su acción sobre diferentes proteínas del ciclo celular y el gen antiapoptótico *Bcl-2* [Diniz *et al.*, 2012]. Este miRNA actúa como supresor de tumores en la leucemia linfática crónica, la leucemia mieloide crónica y el mieloma múltiple [Roccaro *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2012].

El miR-224 es uno de los miRNAs más estudiados. Este miRNA está implicado en la proliferación celular, la migración y la invasión de células de carcinoma hepático y otros tipos de cáncer [Gokhale *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012b]. Yao *et al.* [2010] demostraron que la expresión ectópica de miR-224 regula la proliferación y función de las células a través de su acción sobre SMAD4, molécula clave en la vía de señalización TGF- β . Finalmente, miR-181b-1 es un miRNA sobreexpresado con propiedades prooncogénicas cuyos niveles se encuentran elevados en cáncer gástrico [Guo *et al.*, 2012].

Entre los miRNAs reprimidos podemos citar miR-187, miR-320 y miR-99b. miR-187 presenta propiedades prooncogénicas y sus niveles se encuentran elevados en cáncer de ovario [Chao *et al.*, 2012]. Estudios llevados a cabo por Rossato *et al.* [2012] han demostrado, recientemente, que la estimulación de monocitos humanos con IL-10 incrementa la expresión de miR-187, desempeñando un papel clave en la regulación fisiológica de la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10, al inhibir la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12p40. miR-320 está implicado en la regulación de la isquemia cardíaca, al actuar directamente sobre hsp20, una proteína cardioprotectora [Ren *et al.*, 2009]. Además, es un regulador negativo clave en el cáncer de próstata, al inhibir la vía de señalización Wnt/ β -catenina [Hsieh *et al.*, 2012]. miR-320 también regula la resistencia a insulina en adipocitos al inhibir la vía de señalización insulina/PI3K [Ling *et al.*, 2009]. Recientemente, se ha demostrado que miR-99b funciona como modulador dentro de la compleja red de factores que regulan la transición mesenquimal-epitelial inducida por TGF- β en las células de la glándula mamaria de ratón, así como la proliferación y migración de las células de cáncer de mama [Turcatel *et al.*, 2012]. miR-99b afecta la vía de señalización TGF- β por alteración de la fosforilación de SMAD3. Se han descrito varias dianas de este miRNA que afectan la

vía de señalización TGF- β , entre ellas destaca mTOR [Oneyama *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Turcatel *et al.*, 2012] y TNF- α , que juega un papel en la modulación de la inmunidad del huésped tras la infección por *Mycobacterium tuberculosis* [Shing *et al.*, 2012]. Finalmente, miR-99b actúa como supresor de tumores a través de la regulación negativa del receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) [Kang *et al.*, 2012].

La mayor parte de las investigaciones publicadas hasta la fecha sobre miRNAs se han centrado en demostrar el papel de estas moléculas en cáncer -exhibiendo tanto propiedades prooncogénicas como antioncogénicas [Esquela-Kerscher & Slack, 2006]-, debido a que alrededor del 50% de los genes que codifican miRNAs están localizados en zonas del genoma lábiles -denominadas sitios frágiles- asociadas con el desarrollo de determinados tipos de cánceres [Calin *et al.*, 2004; Sevignani *et al.*, 2006]. Sólo unos pocos estudios han analizado el papel de los miRNAs en otras patologías como la alérgica. Entre estos podemos citar el trabajo de Lu *et al.* [2009]. Dichos autores han demostrado que los niveles de miR-21 están incrementados en la inflamación alérgica de las vías aéreas en ratón, regulando la expresión de IL-12p35. Otro ejemplo es miR-127 que inhibe la respuesta inflamatoria en pulmón, a través de la regulación negativa del mRNA que codifica la proteína Fc γ RI [Xie *et al.*, 2012]. Por último, miR-155 se sobreexpresa en pacientes con dermatitis atópica y debe contribuir a la inflamación crónica de la piel al incrementar la respuesta proliferativa de las células T a través de la supresión del antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) [Sunkoly *et al.*, 2010].

Recientemente y, en relación con la tolerancia inmunológica, miR-23b ha sido propuesto como diana terapéutica para la alergia puesto que induce, *in vitro*, DC con propiedades tolerogénicas y una respuesta Treg, al inhibir las vías de señalización Notch1 y NF- κ B [Zheng *et al.*, 2012].

Predicción de mRNAs diana para los microRNAs

El número de dianas potenciales de mRNA para cada miRNA expresado diferencialmente en los Exo_{Tol} se determinó utilizando el *software* TargetScan (**Tabla 20**). Este *software* es una herramienta bioinformática sencilla para la búsqueda de sitios conservados con emparejamiento restrictivo, con el inconveniente de que subestima aquellos miRNAs con múltiples sitios de unión. Se predijeron entre 100 y 821 mRNAs diana para cada uno de los 10 miRNAs que estaban significativamente sobreexpresados en los exosomas tras la inducción de tolerancia, y entre 4 y 432 dianas para cada uno de los 4 miRNAs que estaban significativamente reprimidos. El elevado número de potenciales dianas predichas para la mayoría de los miRNAs -por ejemplo, 821 dianas potenciales para miR-15a y 613 para miR-218-1-, se debe a que dichas predicciones están basadas fundamentalmente en la complementariedad con la región semilla -o *seed match*- del miRNA (sólo 6-8 nt de longitud), lo que conlleva, además, un cierto número de falsos positivos.

Estos resultados permiten sugerir que la actividad biológica de la mayoría de los miRNAs resultará de la acción (inhibición) coordinada sobre diferentes mRNAs diana. Con el fin de entender el conjunto de actividades de los miRNAs responsables de las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol} es necesario identificar la mayoría de las dianas en nuestro sistema. Para ello se procedió a la búsqueda de los mRNAs diana dentro de los genes diferencialmente expresados en este estudio, utilizando el mismo *software* y considerando tanto los pares miRNA:mRNA correlacionados inversamente como directamente (**Tabla 21**). Dentro de los 10 miRNAs sobreexpresados, sólo 5 presentaban dianas

potenciales en el conjunto de genes diferencialmente expresados: miR-15a, miR-103/107, miR-218-1 y miR-224. Se predijeron 3 dianas potenciales para miR-15a: *Actr1a*, *Rab40b* y *Spr*, genes cuya expresión se encontraba significativamente reprimida en los Exo_{Tol}. Esta correlación inversa entre los niveles de expresión del par miRNA:mRNA, se encontró entre miR-103/107 y su diana potencial *Srgap1*, y entre miR-218-1 y *Spred2* y *Arf6*. Otra diana potencial predicha para miR-218-1 fue *Arhgef12*, un gene sobreexpresado en los Exo_{Tol}. *Arhgef12*, también se predice como diana potencial de miR-224 (gen sobreexpresado) y miR-375 (gen reprimido). Por último, para miR-320 se predice una única diana *Spred2*, cuyos niveles de expresión presentan una correlación directa.

Estos resultados revelan, nuevamente, la complejidad de la red de regulación de los miRNAs por la multiplicidad de dianas potenciales y la acción sinérgica/antagónica entre ellos. En base a estos datos podemos decir que miR-15a y miR-218-1 podrían jugar un papel en las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol} al presentar el mayor número de dianas potenciales dentro de los genes diferencialmente expresados. Entre las dianas predichas podemos destacar *Actr1a*, *Spred2* y *Arhgef12*. Estas proteínas/genes, implicadas en señalización celular y/o la regulación del citoesqueleto, interaccionan entre sí según la red de interacción de proteínas resultante del análisis con el *software STRING*, encontrándose además entre los nodos altamente conectados en la red. Es decir, poseen un gran número de enlaces (conexiones) con otros nodos. Además, *Spred2* y *Arhgef12* son también dianas potenciales de otros miRNAs: miR-320 y miR-375/miR-224, respectivamente.

La búsqueda de potenciales mRNAs dianas para los miRNAs diferencialmente expresados también se llevó a cabo con las proteínas identificadas en los exosomas del BALF, aunque no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de sus respectivos genes (**Tabla 22**).

Tabla 21. miRNAs y sus potenciales mRNAs dianas en la serie de genes diferencialmente expresados en Exo_{Tol} derivados del BALF de ratón.

microRNA	mRNA diana	Posición	Secuencia de apareamiento ¹	Seed match ²	Total Context Score ³	P _{CT} ⁴
<i>Correlación inversa</i>						
miR-15a ↑	Actr1a ↓	322-328	5' ...ACCAUAGAGAGACCUUGCUGCUG... 3' GUGUUUGGUAAUACACGACGAU	7 mer-m8	-0.12	0.49
	Rab40b ↓	3-9	5' ...GAUGCUGCUU... 3' GUGUUUGGUAAUACACGACGAU	7 mer-m8	N/A	0.55
	Srpr ↓	502-508	5' ...UGGCCCAUUCUUAUUGCUGCUA... 3' GUGUUUGGUAAUAC--ACGACGAU	8 mer	-0.45	0.79
miR-103/107 ↑	Srgap1 ↓	254-260	5' ...UACUUGAAAAUCCAUGCUGCA... 3' AGUAUCGGGACAUGUACGACGA...	8 mer	-0.36	0.74
miR-218-1 ↑	Spred2 ↓	1929-1935	5' ...CCUCGCCUCUCUACCAGCACAA... 3' UGUACCAUCUAGUUCGUGUU	8 mer	-0.18	0.93
	Arf6 ↓	2018-2024	5' ...AUCCUGAAACAAAUAAGCACAA... 3' UGUACCAUCUAGUUCGUGUU	8 mer	-0.40	0.57
miR-375 ↓	Arhgef12 ↑	3581-3587	5' ...GGCUGUAUGUUUCUGGAACAAA... 3' AGUGCGCUCGGCUUGCUUGUU	7 mer-1A	-0.20	0.38
<i>Correlación directa</i>						
miR-218-1 ↑	Arhgef12 ↑	359-365	5' ...UCAUCCGUAAUUGAAGCACAC... 3' UGUACCAUCUAGUUCGUGUU	7 mer-m8	-0.27	0.80
miR-224 ↑	Arhgef12 ↑	3681-3687	5' ...AAAAGAACUGAGUAUGUGACUU... 3' UUGCCUUGGUGAU--CACUGAAU	7 mer	-0.33	N/A
miR-320 ↓	Spred2 ↓	2212-2218	5' ...UAGUAUUUCCAGUCAGCUUUG... 3' AGCGGGAGAGUUGGUCGAAAA	7 mer-m8	-0.15	N/A

Se utilizó el programa *TargetScan* para la búsqueda de potenciales mRNAs diana. Las flechas rojas indican los RNAs sobreexpresados y las verdes, los reprimidos.

¹Secuencia complementaria predicha con la región 3' UTR de miRNA.

²7 mer-1A, apareamiento completo entre las posiciones 2-7 del miRNA maduro (*seed*), seguido por una "A"; 7 mer-m8, apareamiento completo entre las posiciones 2-8 del miRNA maduro (*seed* + posición 8).

³El valor *Total Context Score* y las características que contribuyen al mismo se han determinado según Grimson *et al.* [2007].

⁴El valor agregado P_{CT} se ha determinado según Friedman *et al.* [2009]. N/A, no anotado.

Los miRNAs con un mayor número de dianas potenciales en el total de proteínas fueron miR-15a, miR-103/107 y miR-218-1. miR-15a tiene 3 dianas: *Crtc3*, *Htr4* y *Lrp1b*, que codifica para el coactivador transcripcional regulado por CREB3 (*cAMP response element-binding protein*), el receptor 4 de la 5-hidroxitriptamina y la lipoproteína de baja densidad 1B respectivamente. *Htr4* y *Lrp1b* también son 2 de las dianas potenciales de miR-103/107, otra diana es *Actg1* -el gen de la actina-. miR-218-1 tiene como dianas, además de *Crtc3*, los genes de la metalopeptidasa 1 del retículo endoplasmático (*Ermp1*) y el de la teneurina-3 (*Odz3*). No se observó correlación entre miRNAs sobreexpresados con la localización de las dianas en un tipo particular de exosomas. Por último, cabe mencionar a la única diana predicha para el miRNA reprimido miR-320: el gen *Vim* que codifica para la vimentina. Los niveles de expresión de esta proteína parece aumentar en presencia de TGF- β durante el proceso de regeneración tisular guiado por las células epiteliales alveolares [Rogel *et al.* 2011].

Tabla 22. miRNAs y sus potenciales mRNAs dianas en la serie de proteínas identificadas en los exosomas derivados del BALF de ratón.

microRNA	mRNA diana ¹	Seed match ²	Total Context Score ³	P _{CT} ⁴
<i>Sobreexpresados</i>				
miR-7b	Hells	7 mer-m8	-0.25	0.22
miR-15a	Crtc3	7 mer-m8	-0.16	0.68
	Htr4	8 mer	-0.62	0.82
	Lrp1b	7 mer-m8	-0.29	0.68
miR-103/107	Actg1	7 mer-1A	-0.23	0.46
	Htr4	7 mer-m8	-0.14	0.59
	Lrp1b	7 mer-m8	-0.23	0.58
miR-218-1	Crtc3	7 mer-1A	-0.24	0.73
	Ermp1	7 mer-m8	-0.75	0.89
	Odz3	7 mer-m8	-0.36	0.73
miR-224	Kcnma1	7 mer-m8	-0.30	N/A
miR-505	Kcnma1	7 mer-m8	-0.22	N/A
<i>Reprimidos</i>				
miR-320	Vim	7 mer-m8	-0.28	N/A

¹Se utilizó el programa *TargetScan* para la búsqueda de potenciales mRNAs dianas. En azul se muestran las proteínas identificadas en los exosomas tolerogénicos; en morado las identificadas en los exosomas control; y en negro, las identificadas en ambos tipos de exosomas.

²7 mer-1A, apareamiento completo entre las posiciones 2-7 del miRNA maduro (*seed*), seguido por una "A"; 7 mer-m8, apareamiento completo entre las posiciones 2-8 del miRNA maduro (*seed* + posición 8).

³El valor *Total Context Score* y las características que contribuyen al mismo se han determinado según Grimson *et al.* [2007].

⁴El valor agregado P_{CT} se ha determinado según Friedman *et al.* [2009]. N/A, no anotado.

Para tener un dato más sobre la relevancia biológica de la expresión diferencial de estos 14 miRNAs tras la inducción de tolerancia, se determinaron las rutas *KEGG* enriquecidas en sus potenciales mRNAs dianas.

Predicción de rutas de *KEGG* enriquecidas

El software *DIANA LAB* [Papadopoulos *et al.*, 2009] se utilizó para definir las rutas enriquecidas en las dianas predichas para los 14 miRNAs diferencialmente expresados en los Exo_{Tol}. Este software incluye *DIANA miRPath* que compila las listas de dianas predichas para los miRNAs y busca el enriquecimiento de las dianas en las rutas metabólicas anotadas en la base de datos *KEGG*. Para la predicción de las dianas se utilizaron los softwares *TargetScan* y *PicTar*, puesto que varios estudios han indicado que tienen un mayor poder predictivo al estar basados en un estricto emparejamiento de la región semilla [Sethupathy *et al.*, 2006; Alexiou *et al.*, 2009]. Los resultados del análisis fueron convertidos en un mapa de *clustering* jerárquico donde se representaron el número de potenciales mRNAs dianas para cada uno de los miRNA en función de las rutas de señalización (**Figura 33**). De las 149 rutas obtenidas utilizando *TargetScan*, sólo 20 pasaron el filtro de restricción aplicado (Materiales y Métodos, Apartado *Predicción de rutas de *KEGG* enriquecidas*, página 52). El número de rutas enriquecidas fue mucho menor, 8 de 137, cuando se utilizó *PicTar*. Finalmente, el número de rutas enriquecidas se redujo a 5 cuando se consideraron exclusivamente aquellas rutas biológicas predichas por ambos métodos. Estas rutas *KEEG* eran: las vías de señalización TGF- β , ErbB, mTOR, FAK (*Focal adhesion kinase*) y en la guía del axón. Estas vías podrían estar involucradas en el mecanismo de tolerancia inducido por los Exo_{Tol} en nuestro modelo experimental.

El número total de dianas potenciales en las 5 rutas *KEEG* para cada uno de los miRNAs en el software *TargetScan* fue: miR-15a (62), miR-181b-1 (47), miR-320 (40), miR-218-1 (35), miR-7b (19), miR-103/107 (14), miR-224 (11), miR-375 (11), miR-592 (8), miR-672 (6), miR-99b (5), miR-505 (2) y miR-187 (0). En *PicTar*, también, miR-15a (54), miR-103/107 (49), miR-181b-1 (39), miR-320 (26), miR-7b (22) y miR-218-1 (21) fueron los miRNAs con un número total mayor de dianas. En base a estos criterios bioinformáticos, se puede sugerir que miR-15a y miR-103/107 funcionarían como moduladores clave dentro de la compleja red de moléculas implicadas en las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol}. Otros posibles miRNAs involucrados en la inducción de tolerancia serían, atendiendo al número total de potenciales dianas, miR-181b-1, miR-218-1, miR-320 y miR-7b. No obstante, hay que considerar que las herramientas informáticas empleadas presentan limitaciones derivadas de sus propios criterios de selección, lo que conlleva su tasa de falsos positivos y negativos. Este podría ser el caso de miR-99b. Investigaciones realizadas en los últimos años han demostrado que este miRNA regula la vía de señalización TGF- β a través de sus múltiples dianas, entre ellas mTOR [Turcatel *et al.*, 2012].

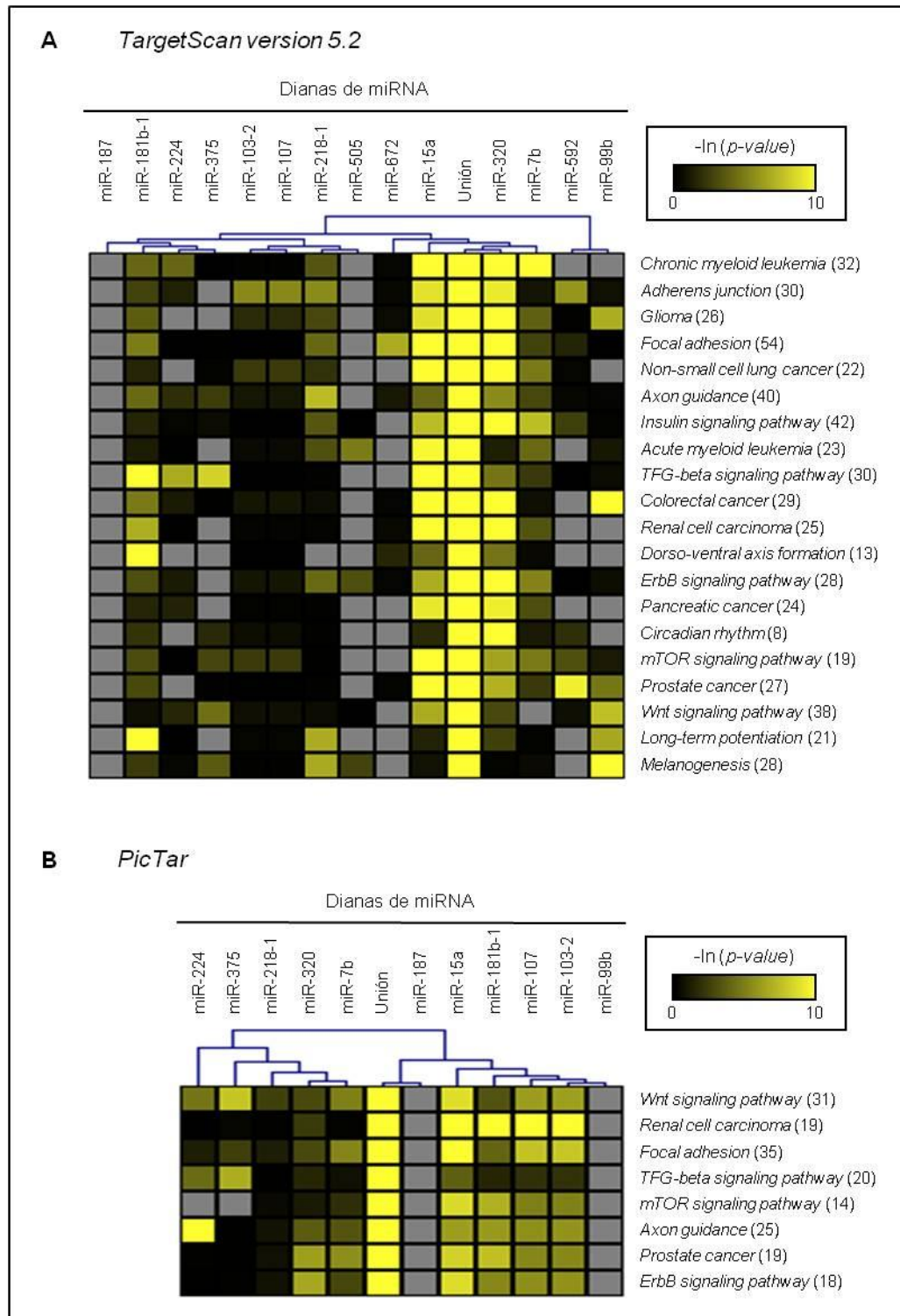


Figura 33. Mapa de *clustering* jerárquico del análisis funcional de los miRNAs expresados diferencialmente en los Exo_{Tol}. Procesos biológicos anotados en la base de datos KEGG que están enriquecidos en los mRNAs diana predichos para los miRNAs. Se utilizaron 2 algoritmos para predecir los mRNAs diana: **(A)** *TargetScan version 5.2* y **(B)** *PicTar*. Los resultados se convirtieron en un mapa de *clustering* considerando como criterio un $-\ln(\text{valor } p)$ de unión >10 . Cada fila representa una ruta y cada columna los mRNAs diana para cada miRNA. El árbol de *clustering* de miRNAs se muestra en la parte superior y el de la vía de señalización a la derecha. Entre paréntesis se indica el número de mRNAs diana potenciales para los miRNAs en cada una de las rutas. La escala de colores ilustra el nivel relativo de dianas de un miRNA a través de todas las rutas.

Hasta ahora se han descrito múltiples proteínas y vías de señalización involucradas en el fenómeno de tolerancia inmunológica, en el que juega un papel central la activación de las vías dependientes de TGF- β . Con el fin de tener una visión integrada de las complejas vías de señalización enriquecidas en dianas de los miRNAs expresados diferencialmente en los exosomas tras la inducción de tolerancia, se procedió a evaluar sus funciones biológicas, moléculas más relevantes y la posible interacción que se da entre ellas (**Figuras 34-38**).

Vía de señalización TGF- β

TGF- β es una citoquina pleiotrópica secretada por diferentes células. Esta citoquina regula una gran variedad de eventos biológicos, tales como el desarrollo embrionario, la maduración y la diferenciación celular. Además, desempeña un papel fundamental en los mecanismos de tolerancia inmunológica, al actuar como un potente inmunosupresor [Mantel & Schmidt-Weber, 2011; Tran, 2012]. La unión del TGF- β a sus receptores, TGF- β RI y TGF- β RII, activa la señalización a través de los factores de transcripción SMAD2, SMAD3 y SMAD4, por fosforilación (**Figura 34**). Numerosos estudios han demostrado el papel de la señalización de SMAD dependiente de TGF- β en la tolerancia [Gu *et al.*, 2012].

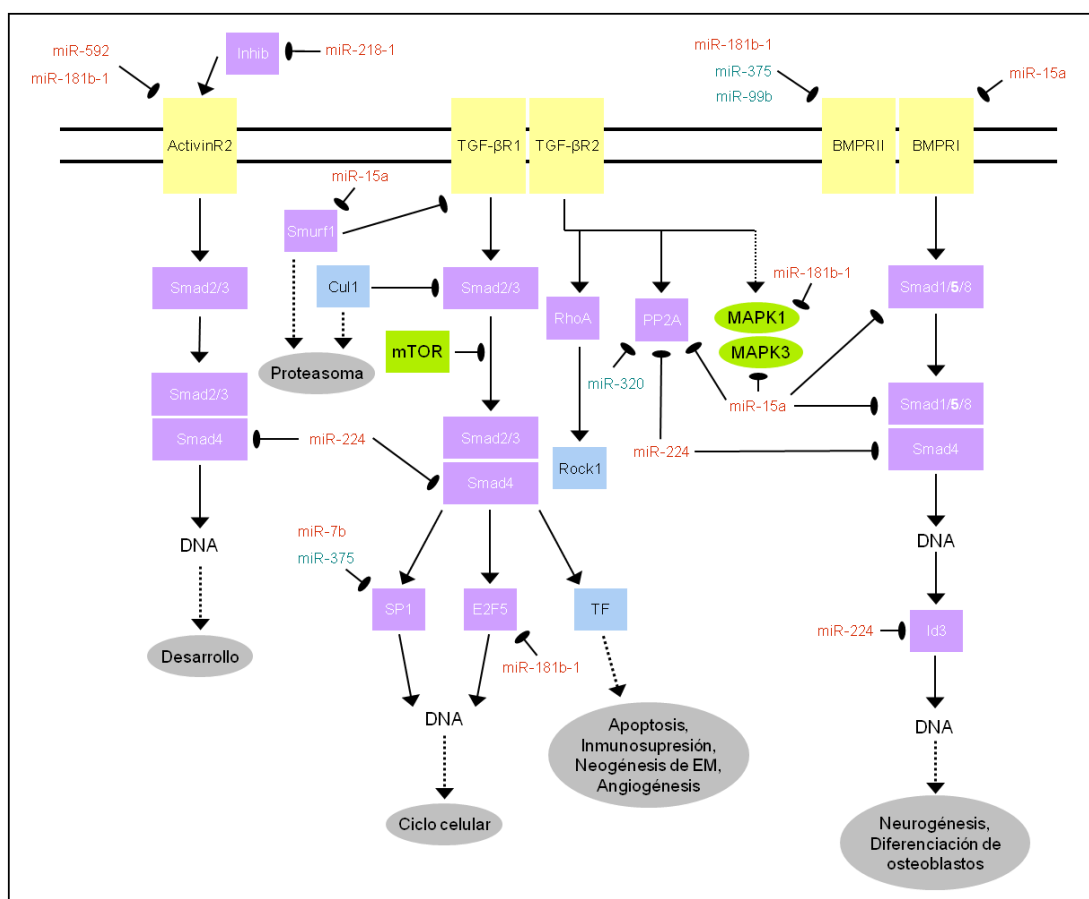


Figura 34. Vía de señalización TGF- β . Se muestran las proteínas cuyos mRNAs son dianas potenciales de los microRNAs expresados diferencialmente en los ExoTol: en rojo, sobreexpresados y en verde, reprimidos. Las proteínas (o genes) identificadas en esta tesis mediante técnicas ómicas se indican con un recuadro azul.

Los efectos del TGF- β sobre las células del sistema inmune son muy variados: por ejemplo, en DCs el TGF- β y la IL-10 son capaces de promover la generación de DCs con propiedades tolerogénicas [Roncarolo *et al.*, 2001], en las células T, esta citoquina inhibe la expresión de GATA-3 [Heath *et al.*, 2000] y T-bet [Gorelik & Flavell, 2000] que controla la diferenciación T CD4⁺ en células Th2 y Th1, respectivamente, e induce la expresión de FOXP3, esencial para su diferenciación en células Treg [Hori *et al.*, 2003].

En nuestro modelo experimental, el aumento en los niveles de expresión de TGF- β en los ratones tratados con los Exo_{Tol} apoyaría participación de esta vía de señalización en el proceso de tolerancia.

En la actualidad, se han descrito varios miRNAs como reguladores clave de la vía de TGF- β , como miR-192 [Kato *et al.*, 2009], miR-155 [Louafi *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2010] y miR-146a [Zhong *et al.*, 2010]. Además, se ha documentado que TGF- β regula la expresión y la actividad de los miRNAs, como miR-99b [Wang *et al.*, 2010a; Turcatel *et al.*, 2012].

La vía de señalización TGF- β interactúa con otras importantes vías moleculares, tales como Wnt, MAPK, PI3K/Akt y también actúa a través de mTOR, el cual es activado mediante fosforilación por el propio TGF- β [Mantel & Schmidt-Weber, 2011; Tran, 2012]. A su vez, mTOR regula negativamente la señalización TGF- β a través de la inhibición de SMAD3.

Vía de señalización mTOR

La proteína mTOR es una serín/treonín-quinasa que regula numerosos procesos celulares al actuar como la subunidad catalítica de dos complejos distintos: el complejo mTOR de tipo 1 (mTORC1) y el de tipo 2 (mTORC2) [Chi, 2012; O'Brien & Zhong, 2012] (**Figura 35**). El complejo mTORC1 tiene como cofactor la proteína RAPTOR (*Regulatory-associated protein of mTOR*) y es sensible a rapamicina. Este complejo regula el crecimiento celular a través de dos vías de señalización: la activación de S6K1 -una quinasa que fosforila la proteína ribosomal S6- y la disociación de la proteína 4E-BP1 del factor de iniciación eIF4E -lo que conlleva un aumento de la síntesis proteica-. mTORC1 es activado por su interacción con Rheb, una pequeña GTPasa [Chi, 2012]. El cofactor del complejo mTORC2 es RICTOR (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*) y no se ve afectado por Rheb. Este complejo regula la actividad de Akt y otras quinasas, como SGK1 y PKC θ , las cuales controlan la supervivencia celular, la proliferación, el metabolismo y la reorganización del citoesqueleto [Chi, 2012].

mTOR regula la expresión de genes clave en la activación de células T mediante el control de diferentes factores de transcripción, como STAT4 y T-bet para Th1, STAT6 y GATA3 para Th2 y STAT3 y ROR γ t para Th17 [Chi, 2012]. Varios estudios han demostrado que la inhibición de mTOR con rapamicina induce anergia en las células T [Zheng *et al.*, 2007], a la vez que estimula la diferenciación de las células T CD4⁺ [Kang *et al.*, 2008] y CD8⁺ [Araki *et al.*, 2009] en células Treg y de memoria, respectivamente. Por otra parte, la estimulación del TCR origina la rápida activación de mTOR, cuya magnitud viene determinada por la duración de la sinapsis inmunológica y por la dosis de antígeno [Chi, 2012]. mTOR también puede ser activado por: factores de crecimiento e inmunomoduladores (leptina y esfingosina 1-fosfato), hormonas y nutrientes (aminoácidos esenciales y glucosa), entre otros. La ruta de señalización de mTOR también se puede activar a través de los receptores tirosín-quinasa de la familia ErbB [Yarden & Slivkowski, 2001].

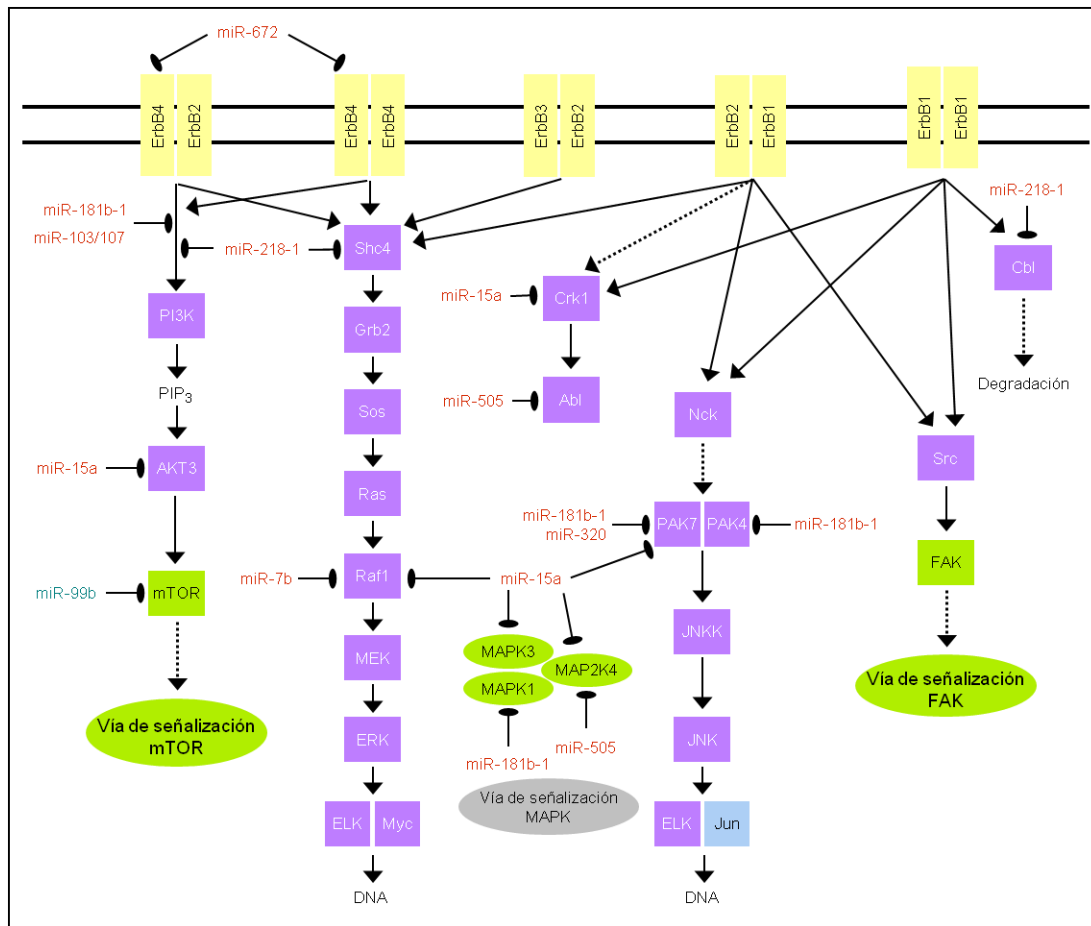


Figura 36. Vía de señalización ErbB. Se muestran las proteínas cuyos mRNAs son dianas potenciales de los microRNAs expresados diferencialmente en los Exo_{T01}: en rojo, sobreexpresados y en verde, reprimidos. Las proteínas (o genes) identificadas en esta tesis mediante técnicas ómicas se indican con un recuadro azul.

En homeostasis del sistema inmune, los receptores ErbB se expresan a nivel basal en los epitelios, pero se inducen en ciertas reacciones inflamatorias y en algunos tipos de cánceres [Mimeault & Batra, 2007; Pastore *et al.*, 2007]. Además, esta vía participa en la respuesta inmune innata al constituir para el organismo una línea de defensa frente a ciertas sustancias dañinas.

Vía de señalización FAK

Los complejos de adhesión focal son puntos de contacto físico entre zonas protuberantes de las células y la matriz extracelular. Este tipo de estructuras especializadas permiten a la célula comunicarse con su entorno y desplazarse [Wehrle-Haller, 2012]. A nivel molecular, las adhesiones focales son los sitios donde las integrinas se asocian con las proteínas talina y α -actinina, las cuales a su vez interactúan con otros componentes del citoesqueleto. Así, las integrinas actúan de puente entre los filamentos de actina y la matriz extracelular. A estos complejos se asocian también diversas proteínas involucradas en la generación de señales, como FAK, las tirosín-quinasas Src y Csk, serín/treonín-quinasas (PKC), quinastas de fosfolípidos (PI3K) y pequeñas GTPasas (Ras y Rho) (**Figura 37**).

tienen papeles clave en diferentes eventos biológicos. Así, las semaforinas y las plexinas están implicadas en el tráfico, activación y diferenciación de ciertas células del sistema inmune [O'Connor & Ting, 2008; Perälä *et al.*, 2012; Goshima *et al.*, 2012]. Hasta la fecha se han identificado siete semaforinas y cuatro plexinas en las células del sistema inmune. Por ejemplo, la señalización Sema3E-Plexina-D1 es necesaria para la migración de los timocitos maduros y la formación de estructuras ordenadas en el timo [Choi *et al.*, 2008], siendo crucial para la trasvasación de las DCs al sistema linfático, al activar la señalización dependiente de Rho que provoca la contracción de citoesqueleto. Además, en las sinapsis inmunes también se activa esta vía de señalización, estando implicada en la producción de citoquinas por las pDCs vía PI3K [O'Connor & Ting, 2008]. En última instancia, la vía de señalización en guía del axón regula el citoesqueleto a través de la activación de FAK.

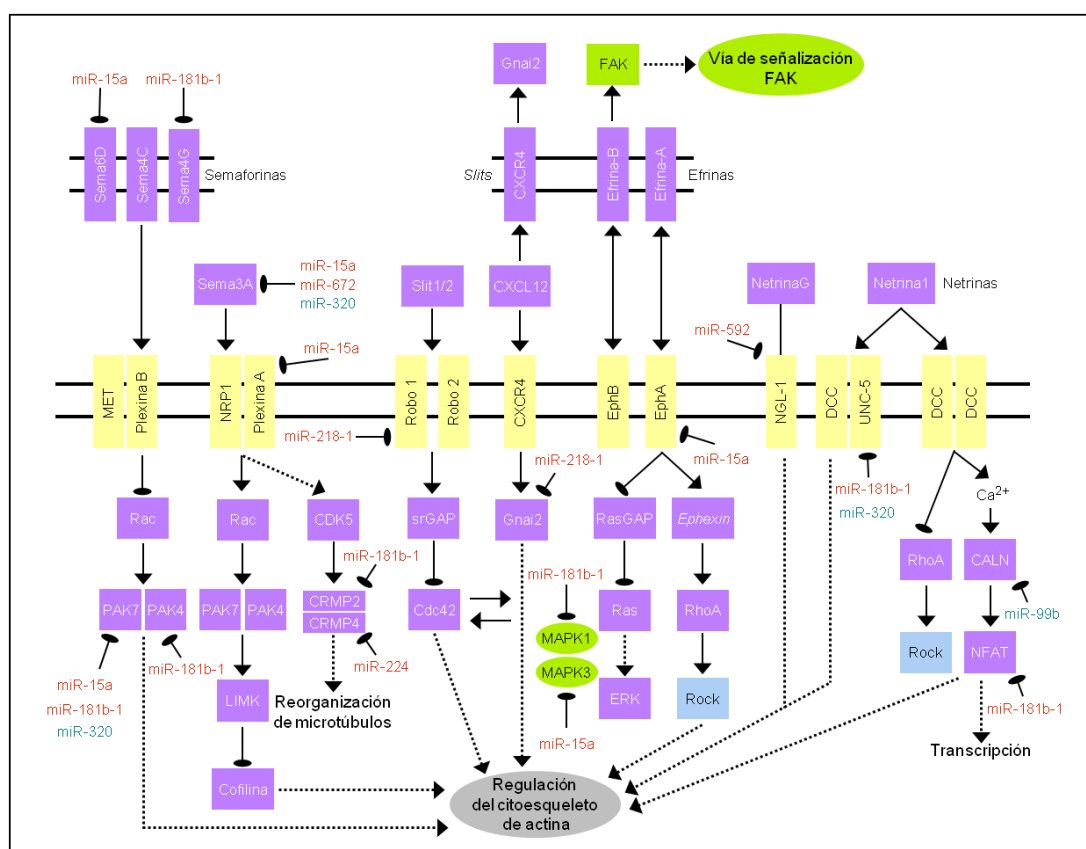


Figura 38. Vía de señalización en guía del axón. Se muestran las proteínas cuyos mRNAs son dianas potenciales de los microRNAs expresados diferencialmente en los Exo_{Tol}: en rojo, sobreexpresados y en verde, reprimidos. Las proteínas (o genes) identificadas en esta tesis mediante técnicas ómicas se indican con un recuadro azul.

Esta breve descripción de las vías de señalización enriquecidas pone de manifiesto la compleja interrelación entre ellas. Además, algunas de las proteínas identificadas en los exosomas, como Jun o Rock, son comunes a varias de ellas. Sería interesante evaluar y verificar la contribución de las distintas vías de señalización en la inducción de tolerancia a través de diferentes abordajes experimentales, como el empleo de RNAs de interferencia o modelos animales *knockout*. La identificación de las moléculas

reguladoras clave podría permitir conocer más íntimamente este mecanismo inmune y el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas específicas para la alergia.

En resumen, el estudio proteómico comparativo ha señalado varias proteínas como posibles candidatas responsables de las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol}. De acuerdo con las funciones inmunomoduladoras destacan la histona H4, la coronina 1A y las proteínas del surfactante pulmonar SP-A y SP-D. Atendiendo al grado de conexión de los nodos de la red de interacción generada por *STRING*: las actinas citoplasmáticas 1 y 2 (ACTB y ACTG1, respectivamente), SP-B y SP-C. En el estudio transcriptómico comparativo, el análisis de la red de interacción entre los genes (proteínas) expresados diferencialmente permitió proponer varios genes potencialmente asociados a las propiedades inmunosupresoras: *Actr1a*, *Spred2* y *Arhgef12*. Además estos genes son dianas de miRNAs diferencialmente expresados en los Exo_{Tol}. Estos genes candidato aparecen en *clusters* implicados, principalmente, en la regulación del citoesqueleto de actina y en las vías de transducción de señales. La presencia e implicación de estas moléculas candidato debe ser verificada mediante técnicas complementarias. Entre ellas, la técnica de RT-PCR (o PCR cuantitativa) representa la metodología más ampliamente utilizada para verificar los resultados obtenidos en los *microarrays* de DNA, ya que permite analizar de una forma precisa y sensible la expresión diferencial. Sin embargo, otros métodos tradicionales como el *Western blot* o el *Northern blot*, en este último caso con menos precisión, también permiten su abordaje. Otras técnicas para analizar la relevancia fisiológica de dichas proteínas/genes serían el ensayo de la enzima luciferasa -como gen reportero- y el empleo de animales *knockout* en los que se ha bloqueado -mediante ingeniería genética- la función de uno o más genes. La principal desventaja de este método es la laboriosidad de las técnicas que engloba. De acuerdo con los resultados de los *microarrays* y los criterios bioinformáticos empleados, se puede sugerir a miR-15a y miR-103/107 como miRNAs candidatos implicados en el efecto inmunoprotector de los Exo_{Tol}. Otro posible miRNA candidato sería miR-99b, por su papel regulador en la vía de señalización TGF- β . Nuestros resultados están basados en herramientas de alta densidad y predicciones computacionales observadas, que conllevan un cierto número de falsos positivos y negativos. Esto hace necesario la validación de los resultados mediante técnicas complementarias más sensibles y específicas que confirmen nuestra hipótesis. Estos estudios engloban, entre otros, cuantificación del miRNA mediante RT-PCR, el bloqueo de la expresión con anti-microRNAs -denominados *antagomirs*- y ensayos de inmunoprecipitación del mRNA diana junto con proteínas asociadas a los complejos miRISC (*miRNA induced silencing complex*).

Además, los datos obtenidos en el estudio proteómico y transcriptómico comparativo realizado en la presente tesis con los exosomas derivados del BALF, sugieren que las células epiteliales pulmonares -en particular las células epiteliales de tipo II- juegan un importante papel en la inducción de tolerancia frente a alérgenos inhalados en nuestro modelo experimental y, en general en la respuesta alérgica a aeroalérgenos. Los exosomas del BALF presentan varias proteínas (y/o genes) características de las células epiteliales como: las proteínas del surfactante pulmonar SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, la uteroglobina, la vimentina, varias queratinas, la moesina, el péptido hepcidina y Mpp7. También se han identificado miRNAs relacionados este tipo celular, como miR218-1 que regula la expresión génica en las

células epiteliales y miR-375 cuyos niveles son elevados en dichas células. En un estudio usando un modelo de ratón, Lo *et al.* [2008] demostraron que las células epiteliales alveolares de tipo II son capaces de inducir tolerancia en células T al suprimir su activación específica de antígeno.

Holgate *et al.* [2000] fueron los primeros en sugerir que los principales responsables del asma eran las células epiteliales. Desde entonces, numerosas evidencias han puesto de manifiesto que el epitelio respiratorio no es una simple barrera física; sino que controla muchos aspectos de la sensibilización alérgica y desempeña un papel clave en la inflamación alérgica, la remodelación y la hiperreactividad bronquial [Holgate & Polosa, 2008; Bulek *et al.*, 2010; Mattila *et al.*, 2011; Lambrecht & Hammad, 2012]. En particular, las células epiteliales alveolares de tipo II ocupan una posición óptima para defender a los pulmones y al cuerpo del bombardeo continuo de antígenos inhalados. Estas células están directamente implicadas en la respuesta Th2, funcionando como interfase entre la respuesta inmune innata y la inmunidad Th2 a través de la producción de una batería de citoquinas, como IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP), entre otras [Bulek *et al.*, 2010]. Además, diversos estudios han demostrado que la activación de las células epiteliales es un evento clave en el reconocimiento de los alérgenos inhalados que activa la red local de DCs, las cuales coordinan la subsiguiente respuesta inmune adaptativa [Lambrecht & Hammad, 2012]. Recientemente, la disrupción de barrera epitelial -lo que resulta en la entrada del alérgeno a los tejidos- se ha incluido dentro de las principales alteraciones que originan las enfermedades alérgicas [Mattila *et al.*, 2011]. Las mutaciones en el gen de la filagrina, una proteína importante en la función de barrera cutánea, están asociadas con la dermatitis atópica y otras enfermedades relacionadas como la alergia al cacahuete [Weidinger *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2012]. La actividad proteolítica de ciertos alérgenos inhalados puede ocasionar un daño funcional del epitelio afectando a las uniones estrechas, lo que conduce a una rotura de la impermeabilidad de la barrera epitelial [Turi *et al.*, 2011]. La actividad proteolítica de Der p 1, un alérgeno principal del ácaro del polvo, le permite atravesar el epitelio e inducir una reacción inflamatoria vía TLR4 [Hammad *et al.*, 2009; Hongjia *et al.*, 2010]. Por el contrario, Der p 2, otro alérgeno principal del ácaro sin actividad enzimática, también activa a las células del epitelio respiratorio vía NF- κ B y MAPK, agravando la enfermedad [Osterlund *et al.*, 2009]. La exposición a sustancias tóxicas, como las del humo del tabaco, pueden dañar y por tanto reducir la función de barrera epitelial frente a los alérgenos, contribuyendo al desarrollo o exacerbación de la enfermedad [Gangl *et al.*, 2009]. Los estudios de asociación del genoma completo (GWA, *Genome-Wide Association*) han permitido identificar varios genes candidato, con función conocida o no, en la barrera epitelial que deben ser analizados en contexto de las enfermedades alérgicas [Swarr & Hakonarson, 2010; Wan *et al.*, 2012].

El transporte activo de los alérgenos a través del epitelio también debe ser considerado en la patogénesis de la alergia. El alérgeno del polen de *Phleum pratense*, Phl p 1, es activamente transportado por las células epiteliales del tracto respiratorio [Blume *et al.*, 2009]. La liberación de TGF- β , IL-6 e IL-8, inducida por Phl p1 en las células epiteliales respiratorias proporcionaría un mecanismo indirecto por el cual el alérgeno atraviesa la barrera epitelial y contribuye a la inducción de la respuesta alérgica al reclutar células inmunocompetentes [Röschmann *et al.*, 2009]. Estudios de inmunolocalización de Bet v 1, en biopsias de conjuntiva, han demostrado el rápido tráfico del alérgeno a través del epitelio en pacientes alérgico pero no en individuos sanos [Renkonen *et al.*, 2009]. Dicho transporte está mediado por *rafts* lipídicos y caveolas [Mogensen *et al.*, 2007; Joenvaara *et al.*, 2009]. Por último, 3

estudios transcriptómicos comparativos de las células del epitelio respiratorio de individuos alérgicos y sanos ha puesto de manifiesto la existencia varios transcritos diferencialmente expresados, de los cuales un elevado número codifican receptores de superficie y proteínas relacionadas con los transporte mediado por *rafts* lipídicos y caveolas, entre ellos SSR4 (*Somatostatin receptor type 4*), TNFL8 (*TNF ligand superfamily member 8*) y la glicoproteína CD59 (también conocida como *MAC-inhibitory protein*) [Joenvaara *et al.*, 2009; Renkonen *et al.*, 2009; Mattila *et al.*, 2010].

Si la alergia se origina, al menos en parte, como consecuencia de la hipersensibilidad del epitelio, esto tendría importantes consecuencias en el diseño de nuevas estrategias para prevenir y tratar las estas enfermedades. Con este objetivo, en Finlandia se ha implantado un programa nacional (*Finnish Allergy Programme 2008-2018*) para reducir el incremento alarmante de las alergias, cambiando el dogma vigente de "evitar el alérgeno" por el nuevo concepto de restablecer e incrementar la tolerancia frente a los alérgenos [Haahtela *et al.*, 2008; Haahtela *et al.*, 2012].

Aunque la importancia fisiológica y la relevancia patológica de los exosomas *in vivo* está por determinar, la identificación en los exosomas derivados del BALF de proteínas/genes implicados en la homeostasis del pulmón como SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, en la respuesta inmune innata y adaptativa, -p. ej., SP-A, SP-D, uteroglobina, Lcn2 e ICAM-1- sugiere un papel importante de estas microvesículas en la fisiología y defensa pulmonar. Así como un papel clave en la comunicación celular por el elevado número de proteínas y genes que participan en la señalización celular y en la regulación del citoesqueleto. Existen estudios que demuestran la presencia de exosomas en el BALF de personas sanas, así como en el de individuos alérgicos al polen de abedul [Admire *et al.*, 2003]. Vesículas similares a exosomas se han detectado, también, en las secreciones de las células epiteliales traqueobronquiales [Kesimer *et al.*, 2009]. En dicho estudio los autores sugieren un posible papel para los exosomas en la fisiología del pulmón y en la regulación de la respuesta inmune pulmonar, innata y adaptativa. El estudio comparativo realizado en la presente tesis apoya esta hipótesis.

En resumen, los estudios de proteómica y transcriptómica comparativa, junto a los de espectroscopía FTIR, llevados a cabo en la presente tesis han permitido proponer un modelo de exosoma "tipo" para los derivados del BALF de ratones BALB/c (**Figura 39**). Las proteínas representadas se identificaron mediante diferentes técnicas, como *Western blot*, citometría de flujo y digestiones enzimáticas seguidas de HPLC-MS/MS. En la figura se representan los miRNAs diferencialmente expresados en los Exo_{Tol} mediante *microarrays* de DNA.

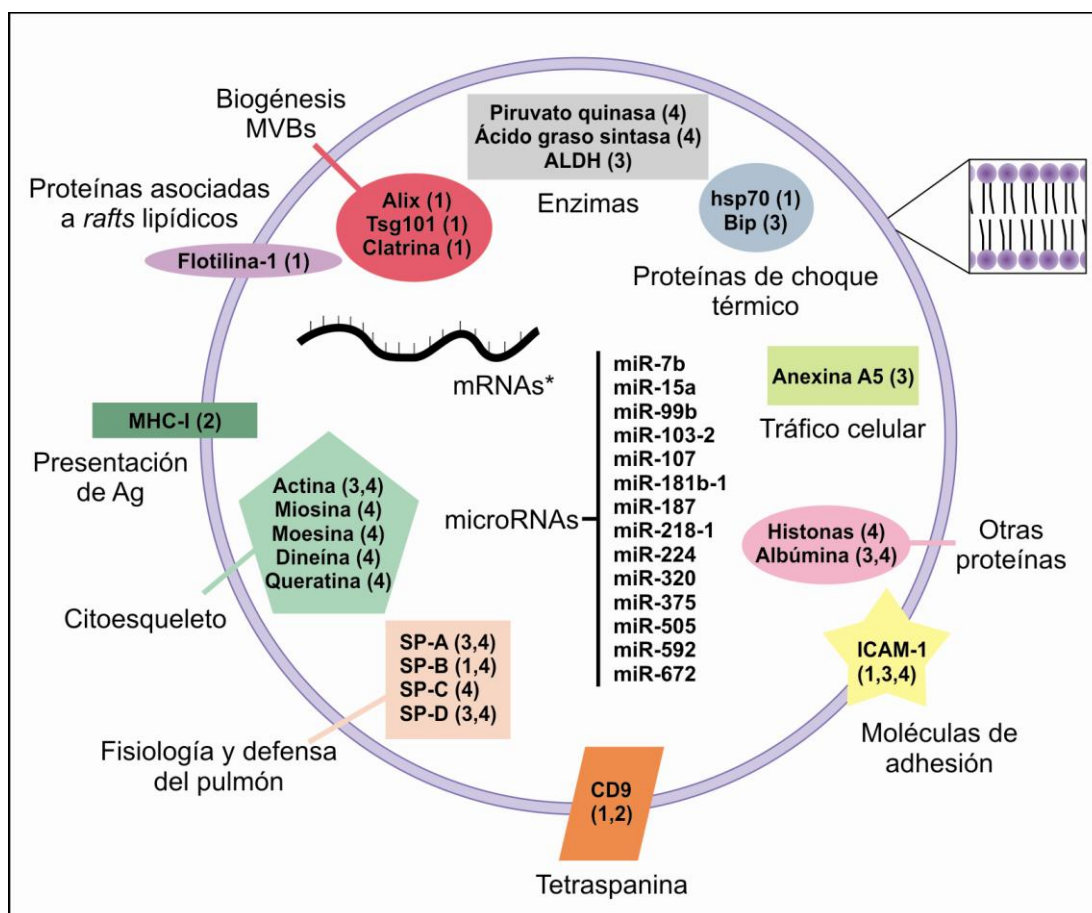


Figura 39. Esquema representativo de la composición molecular de los exosomas derivados del BALF de ratones. Las proteínas aquí representadas, y clasificadas según la función que llevan a cabo, han sido detectadas mediante *Western blot* (1), citometría de flujo (2), digestión trípica de geles y (3) digestión en solución seguida de HPLC-MS/MS (4). Los miRNAs fueron identificados mediante *microarrays* de DNA. La presencia de mRNA fue confirmada mediante *microarrays* de DNA y los lípidos mediante espectroscopía FTIR. Ag, antígeno; ALDH, aldehído deshidrogenasa; MVBs, cuerpos multivesiculares y SP, proteína del surfactante pulmonar. (*) Entre los mRNAs destacan *Actr1a*, *Spred2* y *Arhgef12*, diferencialmente expresados en los Exo_{Tol}.

ANEXO III. EXOSOMAS ALERGÉNICOS: CARACTERIZACIÓN E IMPLICACIÓN EN LA REACCIÓN ALÉRGICA

Hasta la fecha, sólo unos pocos trabajos han analizado el papel de los exosomas en la reacción alérgica, sugiriendo que éstos podrían actuar como inmunomoduladores y contribuir a la respuesta inflamatoria. Admyre *et al.* [2007a, 2008] han demostrado que los exosomas derivados de células B de pacientes alérgicos son capaces de activar células Th específicas y promover una respuesta Th2. Por otra parte, exosomas derivados de macrófagos y DCs contienen enzimas implicadas en la biosíntesis de leucotrienos -potentes mediadores endógenos involucrados en procesos inflamatorios, tales como los asociados a la alergia-, e inducen la migración de granulocitos [Esser *et al.*, 2010]. Dado que los exosomas se han detectado en el BALF tanto de individuos sanos como de pacientes alérgicos [Admyre *et al.*, 2003], el objetivo del siguiente bloque se centró en estudiar si los exosomas derivados de ratones alérgicos podrían jugar un papel en la alergia. Para ello se aislaron y caracterizaron los exosomas derivados del BALF de ratones sensibilizados a Ole e 1 (Exo_{Ale}) y se analizó el efecto de su administración i.n. durante el desarrollo de la respuesta alérgica frente a este alérgeno. Por último, se estudió la capacidad de los Exo_{Ale} de inducir la sensibilización a Ole e 1 *in vivo*.

Aislamiento y caracterización físico-química de los Exo_{Ale}

Los exosomas se aislaron a partir del BALF de ratones sensibilizados a Ole e 1, 24 h después de la última exposición i.n. al alérgeno, según el protocolo estándar de filtración/ultracentrifugación descrito por Théry *et al.* [2006]. El rendimiento del proceso fue de 7.9 ± 1 µg de Exo_{Ale} por ratón, determinado como proteína total (**Figura 40A**). No se encontraron diferencias significativas en cuanto al rendimiento de purificación en comparación con los Exo_{Con} y Exo_{Tol} (6 ± 1 y 7 ± 1 µg de proteína total/ratón, respectivamente). El análisis al microscopio electrónico reveló que los Exo_{Ale} presentaban forma redondeada (**Figura 40B**), con un tamaño comprendido entre 30 y 45 nm (**Figura 40C**), lo que concordaba con lo observado para los otros tipos de exosomas derivados del BALF.

La densidad de flotación en gradiente de sacarosa de los Exo_{Ale} se determinó, tras analizar las fracciones obtenidas por ultracentrifugación, mediante *Western blot* empleando un anticuerpo específico frente al “marcador exosomal” flotilina-1, una proteína implicada en la formación de *rafts* lipídicos [Rajendran *et al.*, 2006; Strauss *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010b] (**Figura 40D**). Los Exo_{Ale} presentaban una densidad de flotación de 1.12 g/ml, comparable a la descrita para los Exo_{Con} y Exo_{Tol}. La presencia de este marcador confirmaba la naturaleza exosomal de estas microvesículas [Théry *et al.*, 2009].

También se confirmó, mediante *Western blot*, la presencia en los Exo_{Ale} de otros “marcadores exosomales”, como CD9 y clatrina (**Figura 40E**). Además, y de forma similar a los Exo_{Con} y Exo_{Tol}, los Exo_{Ale} expresaban la proteína del surfactante pulmonar SP-B, sintetizada y almacenada por las células epiteliales alveolares de tipo II. Este resultado sugería que estas células son una de las principales fuentes de los exosomas presentes en el BALF de ratón. Finalmente, para descartar posibles contaminaciones con vesículas derivadas del retículo endoplasmático se empleó el anticuerpo anti-gp96 que reconoce la glicoproteína gp96, una chaperona específica del retículo endoplasmático [Randow *et*

al., 2001; Han *et al.*, 2010]. La ausencia de marcaje en los Exo_{Ale} puso de manifiesto la pureza de la preparación. En este estudio se utilizaron exosomas derivados de DCs (Dex) como control.

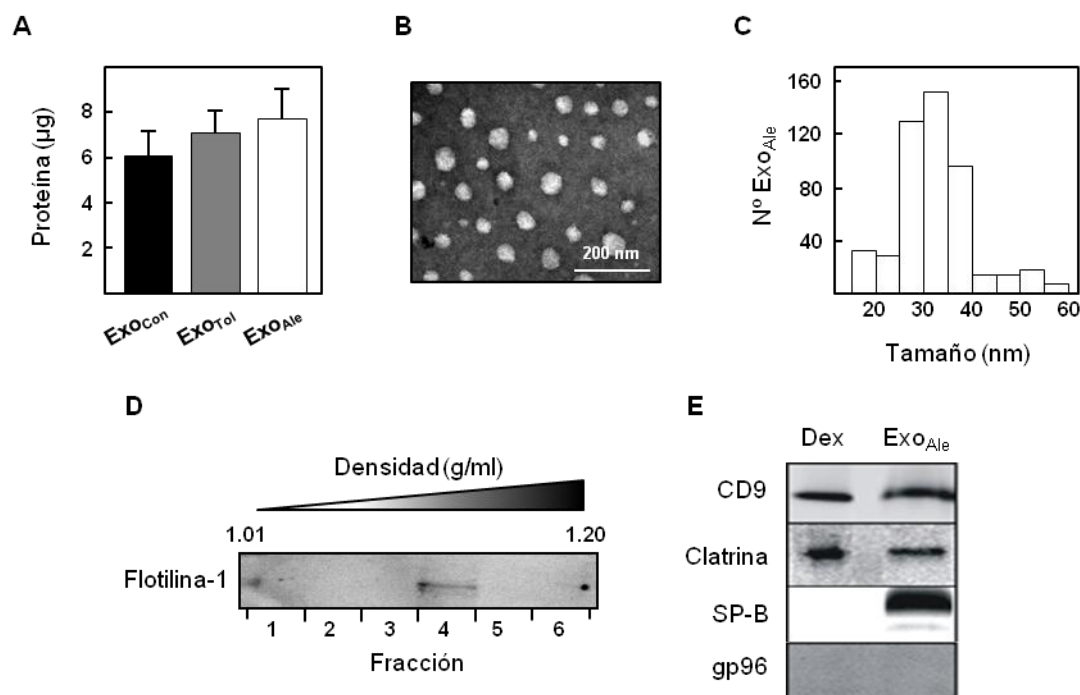


Figura 40. Caracterización de los exosomas derivados del BALF de ratones sensibilizados a Ole e 1. (A) Rendimiento de la purificación de los exosomas derivados del BALF por ratón, determinado como proteína total. Exo_{Con}, exosomas control; Exo_{Tol}, exosomas tolerogénicos; y Exo_{Ale}, exosomas alérgicos. Los datos corresponden a la media \pm SEM ($n=20$ ratones/grupo) de 6 experimentos independientes. (B) Micrografías mediante TEM, (C) distribución de tamaños y (D) densidad de flotación en gradiente de sacarosa de los Exo_{Ale}. Cada una de las fracciones obtenidas tras ultracentrifugación, se analizó mediante *Western blot*, empleando el anticuerpo monoclonal específico anti-Flotilina-1. (E) *Western blot* de los Exo_{Ale} (20 µg), tras PAGE-SDS en gradiente y transferencia a membranas de inmobilon-nylon, empleando los anticuerpos específicos anti-CD9, anti-clatrina, anti-SP-B y anti-gp96. Como control se utilizaron exosomas derivados de DCs (Dex, 10 µg).

Espectro FTIR de los Exo_{Ale}

El espectro FTIR de los Exo_{Ale} era similar al obtenido para los Exo_{Con}, caracterizado por la presencia de 7 bandas de absorción en las regiones asignadas a: lípidos (regiones 1 y 2), proteínas (regiones 3 y 4) y polisacáridos/ácidos nucleicos (regiones 5, 6 y 7) (**Figura 41A**). Con el fin de evaluar la magnitud de las posibles diferencias en los espectros de los exosomas, las 7 regiones espectrales se integraron y se normalizaron con respecto a la región 1 ($2.950\text{--}2.880\text{ cm}^{-1}$), correspondiente a la banda de absorción del enlace carbonilo presente en los lípidos (**Figura 41B**). Sólo se detectaron pequeños cambios entre los 2 tipos de microvesículas en la región 3 ($1.700\text{--}1.600\text{ cm}^{-1}$), correspondiente al enlace amida I. No se encontraron diferencias significativas en las otras regiones analizadas, en ninguno de los espectros adquiridos.

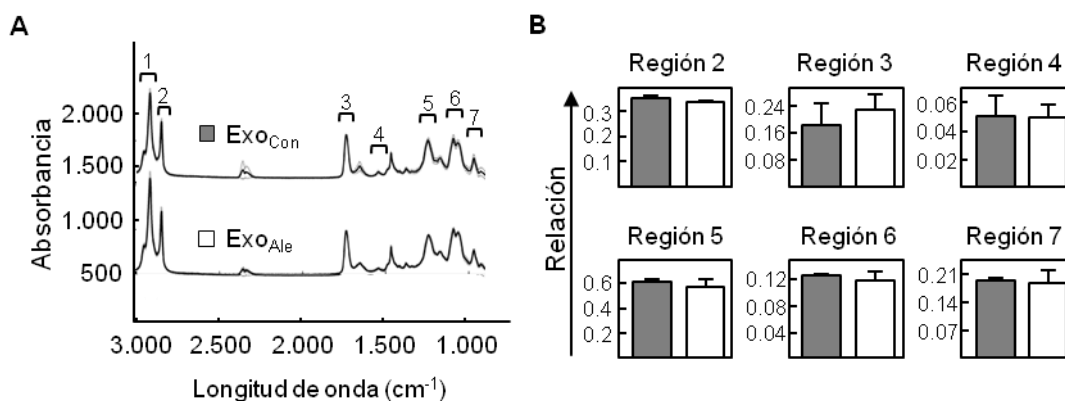


Figura 41. Estudio comparativo mediante espectroscopía FTIR de los Exo_{Con} y Exo_{Ale}. (A) Espectro promedio (línea continua) \pm SD (línea discontinua) de los Exo_{Con} y Exo_{Ale}. Se realizaron 3 experimentos independientes, cada uno por duplicado. Las regiones espectrales estudiadas se indican con números del 1 al 7. (B) Integración y normalización de las regiones espectrales estudiadas con respecto a la región 1, correspondiente a la banda de absorción del enlace carbonilo presente en los lípidos. Los datos corresponden a la media \pm SEM ($n=6$).

Las diferencias observadas en los estudios comparativos mediante FTIR entre ambos tipos de microvesículas podrían dar cuenta de los cambios en el contenido proteico de los Exo_{Ale} como consecuencia de la sensibilización alérgica. Sin embargo, debido al solapamiento de algunos picos y a la baja intensidad de otros, esta técnica no es útil a nivel cuantitativo, por lo que son necesarios ensayos más sensibles y específicos [Kazarian & Chan, 2013]. Así mismo, no se descarta el hecho de que existan cambios en otros tipos de biomoléculas en los Exo_{Ale}, no detectables mediante esta técnica.

Para poder estudiar si estos cambios se traducen en diferentes propiedades *in vivo* se procedió a analizar el efecto de la administración i.n. de Exo_{Ale} durante el proceso de sensibilización a Ole e 1, mediante el análisis de parámetros que caracterizan el estado alérgico: niveles y tipos de anticuerpos séricos, la respuesta de células T específicas en bazo y la respuesta inflamatoria en pulmón. Como grupos control se emplearon ratones pretratados con Exo_{Con} (*sham*) y ratones *naïve*.

Efecto de la administración i.n. de Exo_{Ale} sobre los niveles de anticuerpos específicos en suero

Los niveles de anticuerpos específicos IgE, IgG1 e IgG2a en suero fueron determinados mediante ELISA (**Figura 42**). La administración i.n. de Exo_{Ale} antes de la sensibilización a Ole e 1 no modificó significativamente los niveles de anticuerpos IgE e IgG1, en comparación con los ratones *sham*. Sin embargo, como consecuencia de la administración i.n. de Exo_{Ale}, los niveles séricos de IgG2a específicos se incrementaron un 46% con respecto a los obtenidos en el grupo *sham*.

Estos resultados indican que la administración i.n. de Exo_{Ale} antes de la sensibilización a Ole e 1 no afecta a la síntesis de anticuerpos IgE e IgG1 específicos - isotipos que caracterizan la respuesta alérgica en ratón [Oettegen *et al.*, 1994; Lei *et al.*, 1996; Wiedermann *et al.*, 1999a], a la vez que se incrementan los niveles de IgG2a.

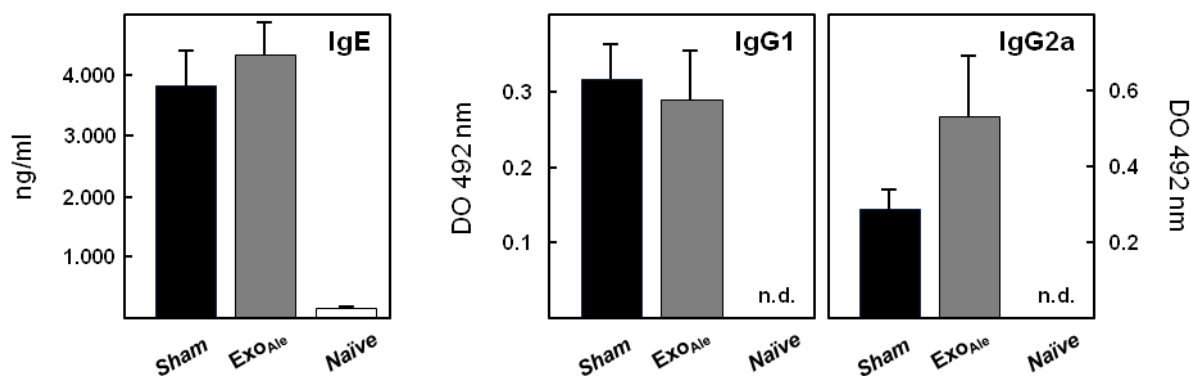


Figura 42. Efecto de la administración i.n. de ExoAle en los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos presentes en suero. Los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos fueron determinados mediante ELISA. **Sham**, ratones pretratados con ExoCon antes de la sensibilización a Ole e 1, ratones alérgicos; **ExoAle**, ratones tratados con ExoAle antes de la sensibilización al alérgeno; y **Naïve**, ratones no tratados. Los datos corresponden a la media \pm SEM ($n=5$ /grupo). Se muestra un experimento representativo de 2 realizados. n.d., no detectado.

Efecto de la administración i.n. de ExoAle en la respuesta de las células T específicas

Para evaluar el efecto de la administración i.n. de ExoAle antes de la sensibilización con Ole e 1 en la respuesta de las células T específicas de bazo, se analizó el patrón de citoquinas presentes en el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos, tras estimularlos con el alérgeno *in vitro* (Figura 43). Los niveles de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ fueron determinados mediante ELISA en sándwich. El pretratamiento con ExoAle incrementó los niveles de las citoquinas de tipo Th2 IL-4 (6 veces) e IL-5 (7.5 veces), mientras que los de IL-13 no se modificaron. Por otra parte, los niveles de la citoquina reguladora IL-10 también estaban aumentados (2.5 veces), al igual que los de la citoquina de tipo Th1 IFN- γ (2.5 veces), en los cultivos procedentes de los animales pretratados con ExoAle. Ninguna de las citoquinas analizadas fue detectada en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de los ratones *naïve* estimulados con Ole e 1 *in vitro*.

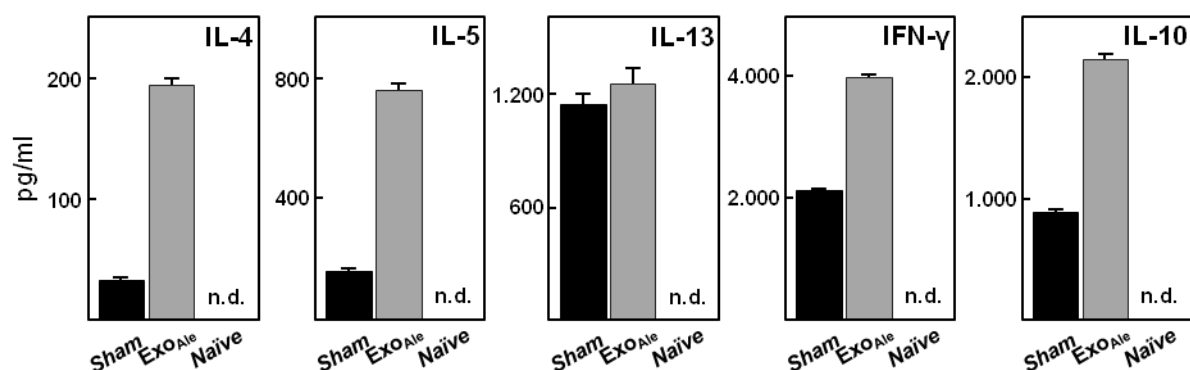


Figura 43. Efecto de la administración i.n. de ExoAle en la respuesta de las células T específicas de bazo. Los niveles de IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ e IL-10, se determinaron mediante ELISA en sándwich en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos 48 ó 72 h tras ser estimulados con Ole e 1. **Sham**, ratones tratados con ExoCon antes de la sensibilización a Ole e 1; **ExoAle**, ratones tratados con ExoAle antes de la sensibilización al alérgeno; **Naïve**, ratones no tratados. Los valores corresponden a la media \pm SEM ($n=5$ /grupo). Se muestra un experimento representativo de 2 realizados. n.d., no detectado.

IL-4 e IL-13 son dos citoquinas particularmente relevantes en la inducción y mantenimiento de las enfermedades alérgicas [Finkelman *et al.*, 2010; van Dyken & Locksley, 2013]. Sin embargo, aunque estas citoquinas pueden mediar efectos fisiológicos similares, parecen estar reguladas por mecanismos diferentes y desempeñan distintos papeles *in vivo* en numerosos aspectos asociados con la alergia. IL-4 tiene un papel dominante en la síntesis de IgE y en la eosinofilia [Munitz *et al.*, 2008; Wills-Karp *et al.*, 1998; Perkins *et al.*, 2006], mientras que IL-13 en la hiperreactividad de las vías aéreas e hiperplasia [Grünig *et al.*, 1998; Wills-Karp *et al.*, 1998]. Además de IL-4 e IL-13, otros factores pueden desempeñar un papel relevante en la reacción alérgica actuando de manera sinérgica o antagónica [Rauh *et al.*, 2005; Pesce *et al.*, 2006; Bosschaerts *et al.*, 2008]. Aunque las citoquinas IL-4 e IFN- γ tienen efectos opuestos y recíprocamente pueden inhibir su producción por las células T, cada una de ellas también puede estimular la producción de la otra. Se ha demostrado que IL-4 induce la síntesis de IFN- γ e IL-10 [Morris *et al.*, 2006], los cuales pueden inhibir ciertos parámetros de la enfermedad, como la síntesis de IgG1, la hiperplasia de las células caliciformes y la hiperreactividad, [Kawano *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2002]. Otro factor que juega un papel importante en la modulación de la respuesta Th2 *in vivo* son las citoquinas IL-25, IL-33 y TSLP, secretadas por las células epiteliales [Bulek *et al.*, 2010]. La desregulación de estas citoquinas origina una inflamación crónica Th2, como la asociada con la alergia. Además de IL-4 e IL-13, la citoquina IL-5 también desempeña un papel importante en la alergia al promover la eosinofilia [Coffman *et al.*, 1989; Holgate *et al.*, 1999; Rothenberg & Hogan, 2006]. Así, el incremento en los niveles de IL-5 inducido por los Exo_{Ale} podría favorecer un mayor reclutamiento de eosinófilos a nivel pulmonar en estos animales. En este sentido, Admyre *et al.* [2007a] han demostrado que los exosomas derivados de células B de pacientes alérgicos inducen la secreción de IL-5 e IL-13 por las células Th2 específicas. Por último, los elevados niveles de IFN- γ podrían contribuir a la fisiopatología de la alergia. Aunque conceptualmente las citoquinas Th1 inhiben el desarrollo de la respuesta Th2 e inducen la síntesis de IgG2a, se ha demostrado que la producción de IFN- γ y TNF por las células Th1 induce apoptosis en las células epiteliales y compromete su función de barrera en la piel y el pulmón, contribuyendo en la fase efectora de la alergia [Akdis *et al.*, 2004a]. En consecuencia, el efecto combinado de varios factores podría traducirse en el patrón de citoquinas y anticuerpos observado como consecuencia del pretratamiento con Exo_{Ale}. Por lo tanto, el ratio de citoquinas IL-10 a IFN- γ e IL-4 es el que va a determinar el tipo de respuesta inmune [Akdis *et al.*, 2004b]. Todos estos datos ponen de manifiesto la complejidad de la reacción alérgica que implica diferentes tipos celulares y de citoquinas.

En conclusión, los resultados indican una mayor expresión de citoquinas de tipo Th2 en los animales pretratados con Exo_{Ale}. Los niveles de IFN- γ podrían contribuir en la fisiopatología de la alergia.

Efecto de la administración i.n. de Exo_{Ale} en la inflamación de las vías aéreas inferiores

Con el objetivo de evaluar el efecto del pretratamiento con Exo_{Ale} en la respuesta inflamatoria desencadenada en las vías respiratorias inferiores, se extirparon los pulmones 24 h después de la última administración i.n. de Ole e 1 para su análisis al microscopio óptico, tras la tinción de secciones pulmonares con H&E o PAS (**Figura 44**).

El examen histológico de las secciones pulmonares de los ratones pretratados con Exo_{Ale} mostró una severa inflamación caracterizada por un infiltrado perivascular y peribronquial con linfocitos y

eosinófilos, comparable a la de los ratones *sham*. Además, el análisis con PAS reveló hiperplasia epitelial con un incremento en las células caliciformes productoras de moco, siendo este efecto ligeramente mayor en los animales pretratados con Exo_{Ale} . Por el contrario, las secciones de pulmón de los ratones *naïve* presentaban una histología normal: parénquima sin infiltrado celular, epitelio cúbico y ausencia de moco.

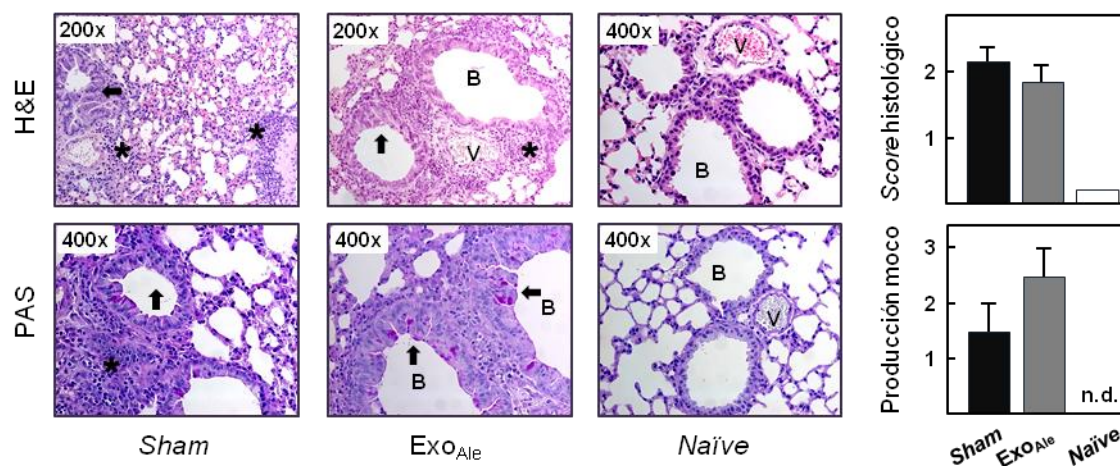


Figura 44. Efecto de la administración i.n. de Exo_{Ale} en la respuesta inflamatoria de las vías aéreas inferiores. (A) Micrografías de secciones de pulmón teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) y ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS). Los asteriscos muestran las zonas de infiltración celular y las flechas, zonas de hiperplasia epitelial con células caliciformes. B, bronquio; V, vaso sanguíneo. (B) Inflamación pulmonar y (C) producción de moco. Los datos corresponden a la media \pm SEM de 2 experimentos independientes ($n=4/\text{grupo}$). **Sham**, ratones tratados con Exo_{Con} antes de la sensibilización a Ole e 1; **Exo_{Ale}** , ratones tratados con Exo_{Ale} antes de la sensibilización al alérgeno; y **Naïve**, ratones no tratados.

Efecto de la administración i.n. de Exo_{Ale} en los marcadores de inflamación ADAM-8 y CCL11

El análisis histológico, de carácter semicuantitativo, no permitió detectar diferencias significativas en la respuesta inflamatoria en pulmón como consecuencia del pretratamiento con Exo_{Ale} . Sin embargo, el incremento observado en los niveles de IL-4 e IL-5, citoquinas reguladoras de la eosinofilia, nos llevó a analizar otros parámetros asociados con la inflamación en bazo y pulmón, dado que varios estudios han señalado que el aumento en los niveles de IL-4 e IL-5 en bazo suele coincidir con un incremento en los niveles de estas citoquinas en pulmón [Morokata et al., 1999; Amuguni et al., 2011].

El primer marcador de inflamación seleccionado fue la quimioquina CCL11. Esta quimioquina coordina, junto con IL-5, la eosinofilia durante los procesos alérgicos, tanto en modelos animales como en humanos [Mould et al., 1997; Rothenberg & Hogan, 2006]. Además, IL-4 e IL-13, inducen la expresión y secreción de CCL11 por los fibroblastos pulmonares y las células epiteliales y de la musculatura lisa de las vías aéreas [Mochizuki et al., 1998; Li et al., 1999; Moore et al., 2001; Teran et al., 1999]. Los niveles de expresión de mRNA de CCL11 se analizaron, en pulmones y bazos, mediante RT-PCR (**Figura 45**). El pretratamiento con Exo_{Ale} provocó un incremento en los niveles mRNA de CCL11 tanto en pulmón (4.1 veces) como en bazo (31 veces). Este resultado indica la correlación existente entre el incremento en los niveles de IL-4 e IL-5 en los cultivos de esplenocitos y el incremento de mRNA de CCL11 en tejidos. A

este respecto, es importante mencionar que la inflamación alérgica se caracteriza por la producción *in situ* de IL-5 y CCL11 [Bozza *et al.*, 1994; Larangeira *et al.*, 2001; Penido *et al.*, 2001; Penido *et al.*, 2006].

La producción de CCL11 también se encuentra modulada por ADAM-8 [Paulissen *et al.*, 2011], uno de los genes candidato de asma [King *et al.*, 2004]. ADAM-8, una desintegrina y metaloproteasa, es un mediador de la inflamación de las vías aéreas en la alergia al regular las funciones de los eosinófilos [Chiba *et al.*, 2011] y de otras células inmunes, como DC y macrófagos alveolares [Higuchi *et al.*, 2002; Matsumo *et al.*, 2008; Paulissen *et al.*, 2011]. Por esto, ADAM-8 fue el otro marcador de inflamación analizado en este estudio. La administración i.n. de Exo_{Ale} provocó un incremento en los niveles de mRNA de ADAM-8 de 1.4 veces en el pulmón y de 35 veces en el bazo, en comparación con los ratones *sham* (Figura 45). Un incremento en la expresión del mRNA de ADAM-8 se ha observado en modelos de ratón de asma alérgica, mediante dos estudios basados en *microarrays* genómicos [King *et al.*, 2004; Di Valentin *et al.*, 2009]. ADAM-8 también se encuentra sobreexpresado en las células del esputo de pacientes asmáticos [Foley *et al.*, 2007; Paulissen *et al.*, 2010]. Además, se ha demostrado que la depleción genética de ADAM-8 protege frente al asma [Chiba *et al.*, 2009; Paulissen *et al.*, 2011]. Estos y otros estudios han permitido identificar a ADAM-8 como un marcador y efector de inflamación alérgica.

El incremento en los niveles de expresión de los mRNAs de CCL11 y ADAM-8 indica que los Exo_{Ale} promueven la respuesta inflamatoria inducida por el alérgeno a nivel local y sistémico.

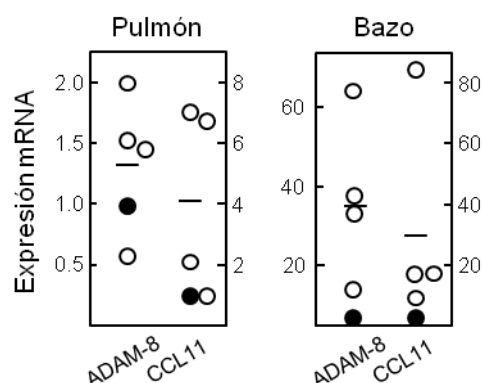


Figura 45. Efecto de la administración de Exo_{Ale} en los niveles de mRNA de ADAM-8 y de CCL11, en pulmón y bazo. Los niveles de mRNA se determinaron mediante RT-PCR utilizando la β -actina como gen normalizador. Los círculos negros representan la expresión, definida como 1, de los mRNAs en los ratones *Sham*; los círculos blancos, la expresión de los mRNAs en los ratones Exo_{Ale} y las barras, la media. Los datos corresponden a 2 experimentos independientes ($n=4$ /grupo).

En conclusión, la administración i.n. de Exo_{Ale} antes de la sensibilización a Ole e 1, favorece el desarrollo de la respuesta alérgica frente al alérgeno al inducir una mayor expresión de citoquinas de tipo Th2 y de los marcadores de inflamación ADAM-8 y CCL11. Estos resultados nos permiten sugerir que los Exo_{Ale} podrían jugar un papel en la respuesta alérgica. Nuestros resultados están en acuerdo con los publicados recientemente por Torregrosa-Paredes *et al.* [2012], donde demuestran que los exosomas derivados del BALF de pacientes asmáticos tienen mayor capacidad para promover la síntesis de leucotrienos y citoquinas proinflamatorias -como IL-8- en células epiteliales bronquiales que los de individuos sanos.

Establecimiento de un modelo de ratón alérgico a Ole e 1 basado en la administración de Exo_{Ale}

Finalmente, se analizó la capacidad de los Exo_{Ale} de sensibilizar a ratones frente a Ole e 1. Para ello se ensayaron 2 protocolos de sensibilización que diferían en la ruta de administración de los exosomas: la ruta i.n. *versus* la i.p.

En un primer protocolo de sensibilización, los Exo_{Ale} se administraron vía i.n. antes de la reexposición i.n. al Ole e 1 en ausencia de adyuvante durante 3 días consecutivos. Posteriormente, el estado alérgico se determinó mediante el análisis de los niveles y tipos de anticuerpos específicos en suero y la respuesta de las células T específicas de bazo. Como grupos control se emplearon ratones sensibilizados a Ole e 1, según el protocolo clásico de Marazuela *et al.* [2008b] -a los que se denominó ratones alérgicos-, y ratones sensibilizados con Exo_{Con} vía i.n.

Determinación de los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos de Ole e 1 en suero

Los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos presentes en suero fueron determinados mediante ELISA (**Figura 46**).

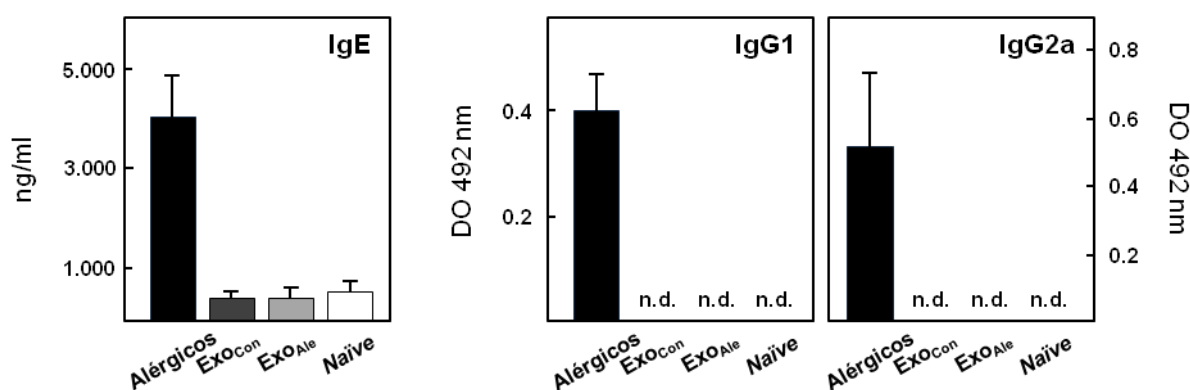


Figura 46. Niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos a Ole e 1, en suero de ratones sensibilizados vía i.n. con Exo_{Ale}. Los niveles séricos de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos se determinaron mediante ELISA. **Alérgicos**, ratones sensibilizados a Ole e 1, según el protocolo descrito por Marazuela *et al.* [2008b]. **Exo_{Con}**, ratones sensibilizados vía i.n. con Exo_{Con}; **Exo_{Ale}**, ratones sensibilizados vía i.n. con Exo_{Ale}; y **Naïve**, ratones no sensibilizados. Los datos corresponden a la media \pm SEM ($n=5$ /grupo). n.d., no detectado.

Tras someter a los ratones al protocolo de sensibilización descrito no se observó un incremento en los niveles de IgE e IgG1 específicos frente a Ole e 1, ni tampoco en los de IgG2a. Sólo se detectó un aumento en los niveles de estos anticuerpos en los ratones alérgicos.

Evaluación de la respuesta de las células T específicas de bazo

Para caracterizar el tipo respuesta desarrollada por las células T como consecuencia de la sensibilización i.n. con Exo_{Ale}, se analizó el patrón de citoquinas producidas por las células esplénicas de los ratones inmunizados, tras ser estimuladas con Ole e 1 *in vitro* (**Figura 47**). La determinación de los niveles de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ se realizó mediante ELISA en sándwich. No se detectó ninguna de las citoquinas analizadas en los cultivos de los animales tratados con exosomas. Tampoco se observaron

niveles detectables de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de los animales *naïve*. Sólo se detectó producción de citoquinas de tipo Th1 y Th2 en los ratones alérgicos. En esta ocasión, no se detectaron niveles significativos de IL-4 en los cultivos, probablemente por una secreción insuficiente o consumo rápido de la misma por las células.

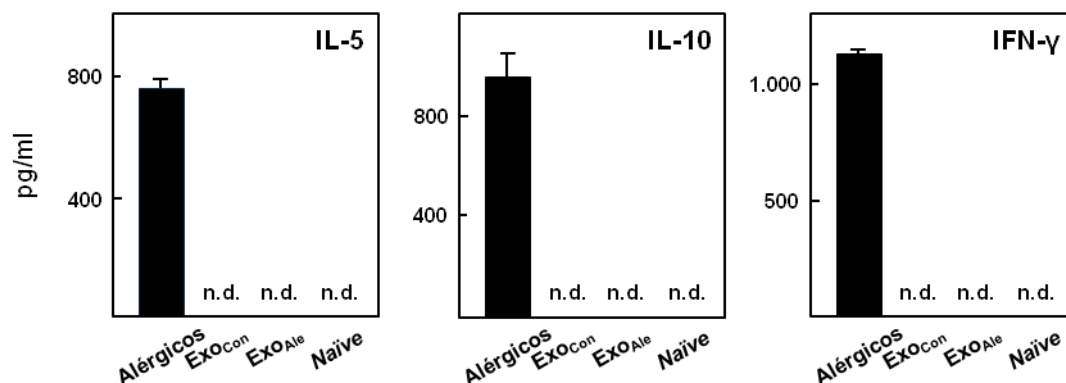


Figura 47. Análisis de la respuesta de las células T específicas de bazo de ratones sensibilizados a Ole e 1 vía i.n. con Exo_{Ale}. Los niveles de IL-5, IL-10 e IFN-γ se determinaron mediante ELISA en sándwich, en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos estimulados con Ole e 1 después de 48 ó 72 h. **Alérgicos**, ratones sensibilizados a Ole e 1, según el protocolo descrito por Marazuela *et al.* [2008b]; **ExoCon**, ratones sensibilizados vía i.n. con ExoCon; **ExoAle**, ratones sensibilizados vía i.n. con ExoAle; y **Naïve**, ratones no tratados. Los datos corresponden a la media ± SEM ($n=5$ /grupo). n.d., no detectado.

Estos datos han puesto de manifiesto que, en las condiciones ensayadas, los Exo_{Ale} no son capaces *per se* de inducir una respuesta alérgica frente a Ole e 1 en ratón, como indican la ausencia de anticuerpos específicos en suero y citoquinas de tipo Th1 y Th2 en los cultivos de bazo. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando los ratones fueron sensibilizados a Ole e 1 mediante la administración i.p. de Exo_{Ale} en ausencia de adyuvante, seguido de la reexposición i.n. al alérgeno. No obstante, hay que señalar que estos estudios son preliminares y se requieren nuevas investigaciones para optimizar el protocolo de sensibilización en los que se modifiquen las condiciones experimentales -tales como la dosis de exosomas y su frecuencia, o su administración junto con adyuvantes- con el objetivo de definir el papel de los exosomas en la reacción alérgica. En este modelo de ratón se ha trabajado principalmente en la fase de sensibilización, por lo que otra condición a ensayar sería la administración i.n. de Exo_{Ale} en la fase de provocación. En general, este protocolo se basaría en una sensibilización sistémica mediante administración i.p. del alérgeno en presencia de Al(OH)₃ con el fin de generar una respuesta inmune de memoria, seguida de la reexposición i.n. a Exo_{Ale} específicos de dicho alérgeno para inducir una respuesta inflamatoria en las vías aéreas.

BLOQUE II. NANOVESÍCULAS DE SECRECIÓN DEL POLEN COMO VEHÍCULOS DE ALÉRGENOS

La liberación de los alérgenos (*biodisponibilidad*) del grano del polen es un requisito para la sensibilización y desarrollo de los síntomas alérgicos en humanos, puesto que el diámetro aerodinámico de los granos -en general, mayor de 20 μm - impide su penetración en las vías aéreas inferiores [Behrend & Becker, 2001; Grote *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2007b]. Hasta la fecha se han descrito, al menos, dos mecanismos de liberación de los alérgenos del grano de polen: (I) **difusión rápida** de los alérgenos, que se produce cuando el grano entra en contacto con un medio isotónico como el de la mucosa del tracto respiratorio superior, y (II) **expulsión de partículas citoplasmáticas** portadoras de alérgenos, tras la hidratación del grano en un medio hipotónico (p. ej., en condiciones de elevada humedad relativa, vientos húmedos o niebla) [Grote *et al.*, 2000; Behrend & Becker, 2001]. Estas partículas citoplasmáticas derivadas del polen se clasifican, en función de su diámetro aerodinámico, en submicrónicas (<10 μm) y paucimicrónicas (<1 μm). Engloban, entre otras, partículas de polisacáridos (partículas-P), gránulos de almidón y partículas subpolínicas (SPPs) [Spieksma *et al.*, 1995; Schäppi *et al.*, 1997; Schäppi *et al.*, 1999a; Schäppi *et al.*, 1999b; Behrendt & Becker, 2001; Grote *et al.*, 2001; Grote *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2004; Bacsí *et al.*, 2006]. Sin embargo, este tipo de estructuras no se han detectado en el polen de olivo [Rodríguez-García *et al.*, 2003]. El mecanismo de liberación de los alérgenos del grano de polen de olivo no se ha dilucidado hasta la fecha. Sin embargo, De Linares *et al.* [2007] han demostrado que la mayor actividad alérgica de Ole e 1, presente en el aerosol atmosférico, está asociada a partículas paucimicrónicas.

El tráfico de vesículas juega un papel esencial en diversos procesos biológicos de la planta, como la respuesta inmune y en su desarrollo [Šamaj *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2008]. En las plantas con flor (angiospermas), el proceso de germinación que se desencadena cuando el grano de polen entra en contacto con un estigma compatible, comienza con la hidratación y activación metabólica del grano de polen. Este proceso continúa con el crecimiento del tubo polínico, cuya función es transportar las células espermáticas hacia el óvulo, y culmina con la fecundación. La elongación del tubo ocurre como consecuencia de un crecimiento celular polarizado, altamente controlado, que requiere de un sistema de secreción eficiente a nivel de la membrana plasmática [Zonia *et al.*, 2010]. Así, este crecimiento es mantenido por la acción continuada de la dinámica del citoesqueleto de actina que transporta vesículas exocíticas, portadoras de materiales precursores de la pared del tubo, a la región subapical del mismo [Moscatelli & Idilli, 2009; Zonia *et al.*, 2010; Zonia & Munnik, 2011]. El proceso de germinación del grano de polen de olivo se puede reproducir *in vitro* [Alché *et al.*, 2004], permitiendo el estudio, entre otros casos, de la secreción de vesículas.

Durante las últimas décadas, los exosomas se han identificado como un nuevo mecanismo de secreción que participan en numerosos procesos biológicos en animales, hongos y bacterias [Nevot *et al.*, 2006; Théry *et al.*, 2006; Nosanchuk *et al.*, 2008; Micali *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2011]. Hasta la fecha, sólo un estudio ha documentado la presencia de vesículas exosoma-like en el fluido apoplástico de las semillas de girasol [Regente *et al.*, 2009; Regente *et al.*, 2012], aunque existen evidencias que sugieren que podrían estar implicadas en la respuesta de defensa frente a patógenos [An *et al.*, 2006; An

et al., 2007; Nosanchuk *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2012]. Estas premisas nos llevaron a plantear como hipótesis de trabajo que los exosomas podrían estar implicados en otros procesos biológicos de las plantas como la germinación y, por ende, el crecimiento del tubo polínico. De ser así, los exosomas podrían constituir, a la vez, un posible mecanismo de liberación de alérgenos en el aerosol atmosférico.

Los polensomas son liberados durante la germinación del grano de polen *in vitro*

Con el fin de determinar si el polen de olivo secreta exosomas durante el proceso de germinación y crecimiento del tubo polínico, los granos de polen se germinaron *in vitro* durante 16 h. Las NVS se aislaron a partir del medio de germinación según el método de filtración/ultracentrifugación, descrito para los exosomas de mamíferos, optimizado para el polen de olivo. El rendimiento del proceso fue de 70 ± 20 µg de NVS por gramo de polen, determinado como proteína total. La identificación de las vesículas como exosomas se llevó a cabo determinando sus características físico-químicas tales como: tamaño, forma y densidad de flotación. Las cuales son factores críticos para diferenciar los exosomas de otro tipo de microvesículas de secreción [Théry *et al.*, 2009].

El análisis al microscopio electrónico reveló que el polen secreta nanovesículas de forma redondeada, con un tamaño comprendido entre 28 y 60 nm de diámetro (**Figura 48A**). Ambas características -forma y tamaño- de las NVS del polen de olivo concordaban con lo descrito para los exosomas o vesículas exosoma-*like* derivados de células de mamíferos, hongos y bacterias [Nevot *et al.*, 2006; Admyre *et al.*, 2007b; Nosanchuk *et al.*, 2008; Micali *et al.*, 2011; Ogawa *et al.*, 2011]: entre ellos, los exosomas derivados del BALF de ratón (30-45 nm), caracterizados en la presente tesis.

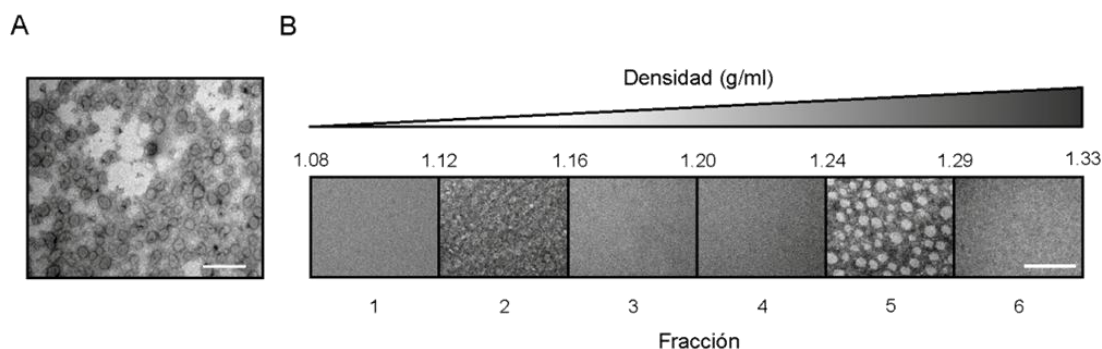


Figura 48. Caracterización de las nanovesículas liberadas por el grano de polen de olivo durante la germinación *in vitro*. (A) Micrografías de las NVS mediante TEM. (B) Densidad de flotación de las NVS (50 µg) en gradiente de sacarosa determinada mediante TEM. Se muestran las micrografías y los valores de densidad de flotación de cada una de las fracciones obtenidas tras ultracentrifugación. Las barras corresponden a 200 nm.

Las NVS presentaban una densidad de flotación en gradiente de sacarosa comprendida entre 1.24 g/ml y 1.29 g/ml, correspondiente a la fracción 5 (**Figura 48B**). En el resto de las fracciones analizadas no se detectaron NVS, ni ningún otro tipo de estructuras vesiculares. El valor de densidad para las NVS resultó ser ligeramente mayor que el descrito para exosomas de mamíferos -comprendido entre 1.10 g/ml y 1.21 g/ml- [Théry *et al.*, 2009], incluyendo entre ellos, los derivados del BALF de ratón

(1.12 g/ml). Este valor podría dar cuenta de las diferencias en la composición molecular, reflejo de las diferencias entre las células animales y vegetales. Estos resultados demuestran que las NVS del polen presentan características físico-químicas similares a los exosomas o vesículas exosoma-like, como el pequeño tamaño o la forma redondeada. Estas similitudes nos han llevado a proponer el término polensomas -del griego *pale*, polvo muy fino, y *soma*, cuerpo- para designar las NVS del polen.

Espectro FTIR de los polensomas de olivo

El análisis del espectro de los polensomas obtenido mediante FTIR confirmó la presencia de proteínas, lípidos y carbohidratos (**Figura 49**). El espectro promedio de los polensomas presentaba dos máximos de absorción en la región comprendida entre los 3.000 y 2.800 cm^{-1} , correspondientes al estrechamiento de los enlaces carbonilo presentes en los lípidos [Pappas *et al.*, 2003; Mehrotra *et al.*, 2010; Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2011]. Este resultado corroboraba la naturaleza lipídica de los polensomas. Las bandas de absorción que se observan en las regiones 1.700-1.600 cm^{-1} y 1.575-1.525 cm^{-1} , se asignan a los enlaces amida I y amida II, respectivamente. Estas bandas corresponden principalmente a los enlaces peptídicos de las proteínas, con pequeñas contribuciones de otros tipos de enlaces amida como los presentes en el lípido esfingomielina [Pappas *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2010; Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2011].

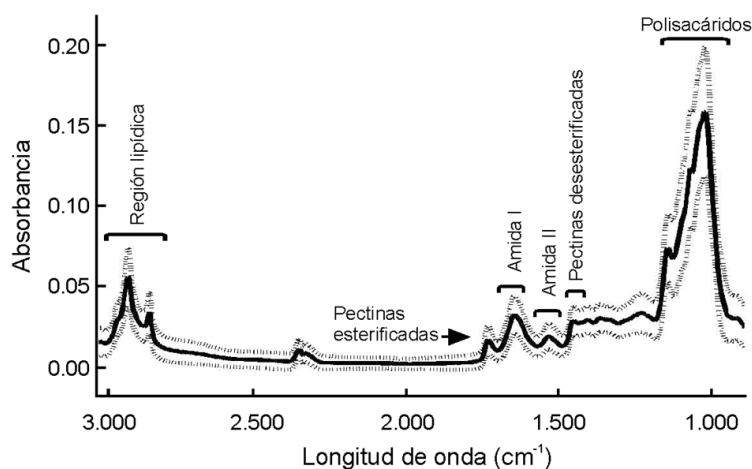


Figura 49. Espectro FTIR de los polensomas de olivo. Espectro promedio (línea continua) de los polensomas \pm SD (línea discontinua) de tres experimentos independientes.

El máximo de absorción a 1.740 cm^{-1} se ha asignado a los ésteres saturados -representativos de las pectinas esterificadas-, mientras que los máximos correspondientes a los grupos carboxílicos de las pectinas desesterificadas se producen entre los 1.600 y 1.414 cm^{-1} [Sun *et al.*, 2009]. La contribución más importante del espectro de los polensomas se observó en la región “huella” (1.200-900 cm^{-1}), correspondiente a los enlaces presentes en otros tipos de carbohidratos, con pequeñas contribuciones de otros enlaces de ácidos nucleicos y proteínas [Pappas *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2008]. La relación de intensidades entre la región “huella” (carbohidratos) y la región lipídica de los polensomas fue de 7.168 ± 0.53 , mientras que en los exosomas derivados del BALF de ratón fue de 1.25 ± 0.03 . Este resultado

muestra que las NVS están enriquecidas en carbohidratos en comparación con los exosomas del BALF de ratón. Este enriquecimiento podría dar cuenta de la mayor densidad encontrada para los polensomas, en relación con los exosomas de animales, presentando ambos tamaños similares. En resumen, el grano de polen de olivo secreta al medio de germinación *in vitro* nanovesículas enriquecidas en carbohidratos. Esta observación concordaba con los estudios llevados a cabo por Van der Woude en el año 1.971, quien describió por primera vez que el polen de *Lilium longiflorum* secretaba al medio de germinación vesículas de unos 50 nm de diámetro, ricas en carbohidratos.

En el área de la palinología y de la fisiología vegetal se han aplicado los estudios mediante FTIR para la identificación rápida de pólenes, así como para la evaluación de cambios en la composición química de la pared celular de células vegetales, incluyendo la del grano de polen [Pappas *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Zimmermann, 2010]. Cabe destacar que el espectro de FTIR de los polensomas es similar al obtenido para el polen, caracterizado por la gran contribución al espectro de la región “huella” [Pappas *et al.*, 2003; Zimmermann, 2010].

La presencia de pectinas esterificadas en los polensomas se confirmó mediante *Dot blot*, empleando el anticuerpo monoclonal específico JIM7 -que detecta homogalacturonanos presentes en las pectinas esterificadas-, tras someter a los polensomas a flotación en un gradiente de sacarosa (**Figura 50**). Como control positivo se empleó pectina de manzana.

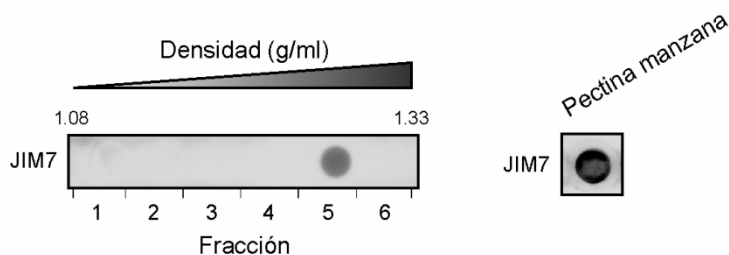


Figura 50. Determinación de la presencia de pectinas esterificadas en los polensomas de olivo. Los polensomas (50 µg) fueron sometidos a flotación en un gradiente de sacarosa y cada una de las fracciones se analizó mediante *Dot blot* empleando el anticuerpo específico JIM7. Como control positivo se empleó pectina de manzana.

El *Dot blot* reveló que las pectinas se localizaban exclusivamente en la fracción 5, correspondiente a la densidad de flotación determinada para los polensomas entre 1.24 g/ml y 1.29 g/ml. Las pectinas constituyen un grupo heterogéneo de carbohidratos que se caracterizan por contener azúcares ácidos, tales como ácido galacturónico, y azúcares neutros, tales como ramnosa, galactosa y arabinosa [O'Neill *et al.*, 1990]. Los principales componentes de la pared del tubo polínico en el ápice son homogalacturonanos y ramnogalacturonanos I y II, donde forman una red que juega un papel central en el crecimiento apical del tubo al controlar la rigidez de la pared celular [Bosch *et al.*, 2005]. La síntesis de las pectinas tiene lugar en el aparato de Golgi y son secretadas en vesículas como polímeros metilesterificados. La enzima PME -que se localiza en la cara externa de la membrana plasmática, en el aparato de Golgi y en el interior de vesículas de secreción que contienen pectinas [Li *et al.*, 2002]- cataliza la desmetilación del grupo carboxílico en la posición C-6 de los residuos de ácido galacturónico de las pectinas [Bosch *et al.*, 2005]. Esta desmetilación cambia el pH y la carga de la pared celular, lo

que tiene lugar en diferentes procesos del desarrollo de la planta, como la maduración del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico [Pilling *et al.*, 2000; Micheli, 2001]. El hecho de que los polensomas contengan pectinas pone de manifiesto su posible papel fisiológico en el crecimiento del tubo polínico.

Análisis proteico de los polensomas

Un primer análisis mediante PAGE-SDS al 15% y tinción con azul de Coomassie de los polensomas reveló un patrón proteico específico que difiere del obtenido para la fracción soluble del medio de germinación -libre de polensomas- y del extracto proteico del polen de olivo (**Figura 51**). Este resultado sugiere la existencia de un posible direccionamiento de moléculas específicas hacia los polensomas y, por lo tanto, una carga de proteínas específica como ha sido descrito para los exosomas [Raposo *et al.*, 1995; Théry *et al.*, 2001; Blanchard *et al.*, 2002].

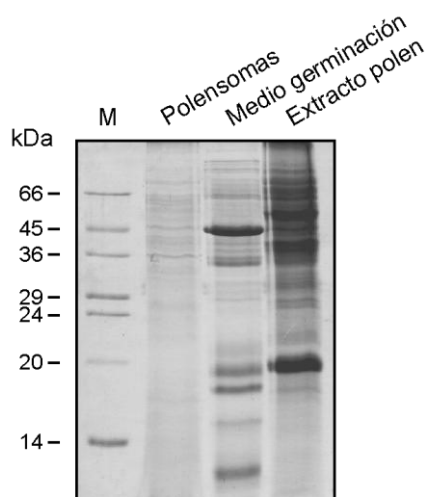


Figura 51. Análisis comparativo del contenido proteico de los polensomas mediante PAGE-SDS al 15% y tinción con azul de Coomassie. Se aplicaron 50 µg de proteína total, en el caso de los polensomas, y 30 µg, tanto del medio de germinación libre de polensomas como del extracto de polen de olivo. M, patrones de masa molecular conocida en kDa.

Determinación del proteoma de los polensomas

La determinación del proteoma de los polensomas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas y secuenciación peptídica *de novo*. Las proteínas fueron identificadas usando la bases de datos NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA). Estas se clasificaron en 7 categorías en base a criterios funcionales: (I) *proteínas del citoesqueleto*, (II) *proteínas implicadas en la remodelación, síntesis y degradación de la pared celular*, (III) *proteínas de defensa o relacionadas con estrés*, (IV) *transportadores de membrana*, (V) *proteínas implicadas en metabolismo y señalización*, (VI) *síntesis y plegamiento de proteínas* y (VII) *otras proteínas* (**Tabla 23**). Muchas de las proteínas identificadas no presentaban una función conocida.

Un elevado porcentaje de las proteínas identificadas pertenecen a la categoría funcional de *metabolismo y señalización*, entre ellas las enzimas fructoquinasa, fosfoglicerato mutasa y GAPDH. Otras categorías están formadas por: proteínas implicadas en la *síntesis y plegamiento de proteínas* (p. ej., la peptidilprolil isomerasa y la hsp70); *transportadores de membrana*, como el transportador de sorbitol, manitol o glucosa; y proteínas implicadas en la *remodelación, síntesis y degradación de la pared celular*, como la PME. También se han identificado *proteínas implicadas en la respuesta frente al estrés* y

en la defensa, como la monodeshidroascorbato reductasa, la 5-metiltetrahidropteroilglutamato homocisteín metiltransferasa y la PCBER [Karamloo *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2012].

Algunas de las proteínas identificadas en los polensomas han sido descritas previamente en los exosomas, por ejemplo, la actina, la hsp70, la GAPDH y la S-adenosil homocistein hidrolasa [Mathivanan & Simpson, 2010]. La actina es un componente clave en el citoesqueleto y, por lo tanto, es esencial para el crecimiento del tubo polínico ya que gracias a ella se transportan los materiales necesarios para la formación de la pared celular en la zona de crecimiento del tubo polínico [Vidali *et al.*, 2009]. Además, la actina es importante para mantener la estructura de las vesículas [Collins *et al.*, 2011]. Por último, la actina también ha sido identificada en pólenes de diferentes especies, como *Arabidopsis thaliana* [Holmes-Davis *et al.*, 2005], colza (*Brassica napus*) [Sheoran *et al.*, 2009], arroz (*Oryza sativa*) [Dai *et al.*, 2006a], tomate (*Lycopersicon esculentum*) [Sheoran *et al.*, 2007] o pino (*Pinus sylvestris*) [Li *et al.*, 2010]. Aunque los polensomas y los exosomas contienen un gran número de proteínas en común, la presencia en los polensomas del marcador exosomal Rab11A, proteína clave en los eventos de tráfico intracelular [Regente *et al.*, 2009] o del receptor del *sorting* vacuolar (VSR), que juega un papel importante en las vías de secreción en plantas [Lam *et al.*, 2007] todavía están por confirmar.

Es interesante destacar que algunas de las proteínas identificadas han sido descritas como alérgenos del polen de olivo: Ole e 1 [Villalba *et al.*, 1993], Ole e 11 que corresponde a la PME [Salamanca *et al.*, 2010] y Ole e 12 que corresponde a la PCBER [Castro *et al.*, 2006]. La PME, como se ha comentado con anterioridad, controla la rigidez de la pared celular y el crecimiento del tubo polínico. Además, la presencia en los polensomas de la enzima junto con su sustrato, la pectina, sugiere la posible implicación de estas nanovesículas en la remodelación de la pared celular, proceso clave para el crecimiento del tubo polínico. La enzima PCBER (Ole e 12) presenta alto grado de identidad de secuencia con isoflavonas reductasas (IFR) y *pinoresinol-lariciresinol reductases* [Karamloo *et al.*, 1999]. Estas enzimas están implicadas en la biosíntesis de lignanos e isoflavonas y, por lo tanto, en la respuesta frente al estrés y en la defensa de la planta [Gang *et al.*, 1999; Min *et al.*, 2003; Brandalise *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010]. Además, Ole e 12, al igual que Ole e 11, presenta reactividad cruzada entre pólenes, frutas y vegetales [Karamloo *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2010; Salamanca *et al.*, 2010]. El alérgeno Ole e 1 pertenece a una amplia familia de proteínas denominadas Ole e 1-like, que se expresan específicamente en el polen [Villalba *et al.*, 1994] y se ha sugerido que podría estar implicado en los procesos de fertilización, tanto en la hidratación del polen como en la germinación [Muschietti *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2002; Alché *et al.*, 2004]. LAT52, proteína homóloga a Ole e 1 en tomate (*Solanum lycopersicum*), interacciona con 2 receptores tirosina quinasa (LePRK1 y LePRK2). La señalización a través de esta vía parece estar implicada en la regulación de la iniciación, mantenimiento y guía del crecimiento del tubo polínico [Muschietti *et al.*, 1994]. Estas funciones concordarían con la localización de Ole e 1 en la región externa de la exina del polen, en la región apical y subapical del tubo polínico, y en el medio de germinación *in vitro* [Martín-Orozco *et al.*, 1994; Alché *et al.*, 1999; Alché *et al.*, 2002; Alché *et al.*, 2004].

En resumen, el grano de polen almacena una gran variedad de sustancias, las cuales desempeñan importantes papeles en su germinación y en el crecimiento del tubo polínico. La germinación del grano de polen es un evento que requiere un gran aporte de energía, así como la síntesis y deposición de materiales nuevos en la célula en crecimiento [Hepler *et al.*, 2001; Cheung &

Wu, 2008]. El grano de polen, junto con las células del ápice de la raíz, son las células que presentan una tasa de crecimiento más elevada [Schiefelbein *et al.*, 1993]. La identificación en los polensomas de proteínas implicadas en el metabolismo y señalización, remodelación, síntesis y degradación de la pared celular o incluso en la síntesis y plegamiento de proteínas, sugieren la posible implicación de este tipo de nanovesículas en la germinación del grano de polen, así como su posible papel en la respuesta frente al estrés y en la defensa contra el ataque de patógenos.

Tabla 23. Proteínas identificadas mediante HPLC-MS/MS y secuenciación *de novo* en los polensomas de olivo.

Proteína	Secuencia peptídica <i>de novo</i>	Score (%)	Valor-e (BLAST)	Secuencias homólogas en otras especies (%)
Proteínas del citoesqueleto				
Actin-1	AEYDESGPS(I/L)VHR	99.99	0.012	AEYDESGPSIVHR <i>Zea mays</i> (100)
Actin	FME(I/L)PDGQV(I/L)T(I/L)GAER	99.75	0.039	ELPDGQVITIGAER <i>Camellia sinensis</i> (85)
Remodelación, síntesis y degradación de la pared celular				
UDP-glucose dehydrogenase	(I/L)S(I/L)YDPQVTEQ(I/L)QR	99.99	6e ⁻⁴	LSIYDPQVTEQIQR <i>Arabidopsis thaliana</i> (86)
Pectin methylesterase precursor (Ole e 11)*	(I/L)YGFQDT(I/L)NC _{cam} DK	99.81	26	YGFQDTL-CD <i>Olea europaea</i> (90)
Proteínas de defensa o relacionadas con estrés				
Monodehydroascorbate reductase	G(I/L)SDFGVQQDAK	81.16	111	LSDFGVQGADAK <i>Cucumis sativus</i> (83)
	(I/L)SDFGVQGADAK	80.70	0.053	LSDFGVQGADAK <i>Cucumis sativus</i> (100)
	WGAF(I/L)ESGTEEPNK	90.07	0.095	WGAFLESGTPEENK <i>Camellia sinensis</i> (86)
Monodehydroascorbate reductase (NADH)-like protein	(I/L)EDDADK(I/L)VEA(I/L)K	99.11	2.4	DDADKLVEAIK <i>Arabidopsis thaliana</i> (90)
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	FA(I/L)ESFWDGK	99.99	0.23	FALESFWDGK <i>Zea mays</i> (100)
	(I/L)PSTEE(I/L)ADR	99.98	112	PSTEEIADR <i>Zea mays</i> (88)
	(I/L)YDWAVHSFR	77.40	11	DWAVHSFR <i>Zea mays</i> (100)
NBS-LRR type disease resistance protein	QLDS(I/L)VADR	98.25	135	QLDSLVGDR <i>Ipomoea batatas</i> (88)
Phenylcoumaran benzylic ether reductase (Ole e 12)*	VAFNEENDLGTYT(I/L)K	99.69	0.56	FNEEHDIGTYTIK <i>Nicotiana tabacum</i> (76)
Immediate early fungal elicitor protein CMPG1	A(I/L)DADNAE(I/L)(I/L)AATNK	95.96	14	LSADDAAELLAA <i>Zea mays</i> (83)
Transportadores de membrana				
Arabidopsis H ⁺ -ATPase 6	HHEQEAA(I/L)(I/L)VPGD(I/L)(I/L)S(I/L)K	99.99	0.012	EQEAAILVPGDLISIK <i>Arabidopsis thaliana</i> (80)
Arabidopsis H ⁺ -ATPase 7	(I/L)DQSA(I/L)TGES(I/L)PVTK	99.49	9e ⁻⁴	DQSALTGESLPVTK <i>Arabidopsis thaliana</i> (100)
Putative plasma membrane ATPase	(I/L)PVEQVFEQ(I/L)HHR	99.99	25	PVEEVFEQL <i>Arabidopsis arenosa</i> (88)
Sorbitol transporter	(I/L)APVYSAEVSWWR	95.16	19	APVYSAEVS <i>Malus x domestica</i> (100)
Mannitol transporter	(I/L)TEDVEE(I/L)FGTFFR	99.17	0.23	EEVEEVFGTFFR <i>Artemisia annua</i> (83)
Monosaccharide transporter 2	MPTGVDEEYND(I/L)(I/L)NAS(I/L)ESQK	82.83	1.8	VDEEFNDLVAASEESRK <i>Olea europaea</i> (70)
Monosaccharide transporter	QQNVDEEYSD(I/L)(I/L)EASEAAK	100	0.016	NVDEEFNDLVEASEKAK <i>Populus tremula</i> x <i>Populus tremuloides</i> (76)
Glucose transporter	NVDDVDQEFMD(I/L)(I/L)NAS(I/L)ESQK	99.98	0.73	VDDVSQEFDLVAASKESQ <i>Arabidopsis thaliana</i> (73)
Sugar transport protein	TSDS(I/L)EDAQ(I/L)R	91.57	1.4	TSDSLVEAQLR <i>Coffea canephora</i> (90)
Putative ammonium transporter	TSGNYYGQWSVAGR	99.51	0.095	TSGSYYGQWSAVGR <i>Camellia sinensis</i> (78)
Metabolismo y señalización				
Adenosylhomocysteinase	EDT(I/L)QEYWWM _{ox} NER	99.56	2.4	ETLQEYWWCSER <i>Medicago truncatula</i> (75)
	WVFPETK	99.99	58	WVFPETK <i>Medicago truncatula</i> (100)
Aspartate aminotransferase	(I/L)(I/L)FGADSV(I/L)QENR	99.99	1.8	LIFGADSPAQENR <i>Triticum aestivum</i> (78)
Alpha-1,4-glucan-protein synthase	QSPGFDYE(I/L)YNR	99.94	1	GFDYELYNR <i>Zea mays</i> (100)
Beta-fructofuranosidase	C _{cam} PPSYT(I/L)GTYDTEK	99.99	14	YTLGTYDTKK <i>Arabidopsis thaliana</i> (90)

Tabla 23. (Continuación) Proteínas identificadas mediante HPLC-MS/MS y secuenciación *de novo* en los polensomas de olivo.

Proteína	Secuencia peptídica <i>de novo</i>	Score (%)	Valor-e (BLAST)	Secuencias homólogas en otras especies (%)
2,3-biphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	(I/L)DQ(I/L)Q(I/L)(I/L)(I/L)K	93.54	9.6	LDQLQLLLK <i>Zea mays</i> (100)
	(I/L)YEGEGFNY(I/L)K	98.43	404	LYEGEGFKYIK <i>Prunus dulcis</i> (81)
	TSGEY(I/L)VHD(I/L)GR	99.93	34	TSGEYLVHN <i>Ricinus communis</i> (88)
Catechol O-methyltransferase	YFVKDEDNS(I/L)HP(I/L)(I/L)A(I/L)YQDK	99.99	0.3	FFVRDEDGASMGPLLALLQDK <i>Nicotiana tabacum</i> (66)
Farnesyl pyrophosphate synthetase	YS(I/L)S(I/L)HR	99.99	341	YSLSLHR <i>Olea europaea</i> (100)
Fructokinase	APGGAPANVALAVAR	96.34	0.004	APGGAPANVAIAVAR <i>Arachis hypogaea</i> (100)
	(I/L)DDASAM _{ox} SLWHDN(I/L)K	99.99	0.016	DDATAMSLWHPNLK <i>Beta vulgaris</i> (85)
	(I/L)P(I/L)WPSADEAR	99.80	0.23	LPLWPSAEEAR <i>Beta vulgaris</i> (90)
	TPDELNLE(I/L)(I/L)R	96.26	4.4	TPDELNLDLIR <i>Beta vulgaris</i> (81)
Fructokinase-1	TA(I/L)AFVT(I/L)R	99.99	17	TALAFVTLR <i>Zea mays</i> (100)
Fructokinase-like protein	SSSHGSVDAFHVK	99.80	7.9	HGSVDAFHV <i>Cicer arietinum</i> (100)
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	VPTVDVSVVA(I/L)TDR	96.02	0.007	VPTVDVSVVDLTDR <i>Mallotus resinus</i> (92)
Isopentenyl diphosphate isomerase	(I/L)ESEN(I/L)(I/L)HR	87.54	42	ESENLLHR <i>Solanum lycopersicum</i> (100)
Phosphofructokinase V11	FGPQ(I/L)(I/L)SNVQSC _{cam} A(I/L)SAEK	99.97	25	QLISNV-CTDALSAEK <i>Gossypium hirsutum</i> (70)
Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit	(I/L)TLFD(I/L)TK	99.99	67	LTLFDLTK <i>Citrus sinenses</i> x <i>Poncirus trifoliata</i> (100)
	NQFVETNVGFDQVM _{ox} K	96.99	0.039	NQFVETNVGFD <i>Citrus sinenses</i> x <i>Poncirus trifoliata</i> (100)
Phosphoglycerate mutase	A(I/L)EYDDFDKFDR	99.99	0.009	ALEYEDFDKFDR <i>Solanum tuberosum</i> (91)
NADP-dependent malic enzyme	FAHHSGSPFDPVEYDGK	98.41	4 e ⁻⁴	FA-SGSPFDPVEYDGK <i>Oryza sativa</i> (88)
	SPAVKYQNPPSAVFTQE(I/L)QEK	97.76	1.8	PPS-VFNQELQEK <i>Phaseolus vulgaris</i> (84)
Putative S-adenosylmethionine synthetase	A(I/L)GVAEP(I/L)SVFVDITYK	94.10	5x10 ⁻⁵	AIGVAEPLSVFVDITYK <i>Capsicum annuum</i> (100)
	(I/L)GGFTSADVGLDADK	98.83	0.053	GFTSADVGLDAD <i>Capsicum annuum</i> (100)
S-adenosyl-L-methionine synthetase	V(I/L)VN(I/L)EQQSPDRSYAK	95.66	1	VLVNIEQQSPD <i>Chrysanthemum coronarium</i> (90)
S-adenosyl-homocysteine hydrolase	EGTLQEYWW _{ox} NER	86.55	2.4	EGETLQEYWWCTER <i>Nicotiana suaveolens</i> (78)
	VWM _{ox} GRTNSG(I/L)(I/L)V(I/L)AEGR	89.86	7.8	TNSGIIVLAEGR <i>Nicotiana benthamiana</i> (83)
	GKTFPDTNSG(I/L)(I/L)V(I/L)AEGR	99.48	0.005	FDPTNSGIIVLAEGR <i>Nicotiana benthamiana</i> (86)
	TEFGPSQPFK	95.71	0.56	TEFGPSQPFK <i>Petunia x hybrida</i> (100)
Serine hydroxymethyltransferase	G(I/L)(I/L)EA(I/L)GSA(I/L)TNK	98.79	4.4	MEALGSALTNK <i>Zea mays</i> (90)
Síntesis y plegamiento de proteínas				
Heat shock protein 70	YTDASVQSD(I/L)K	99.90	11	FTDASVQSDMK <i>Camellia sinensis</i> (81)
Peptidyl-prolyl isomerase	(I/L)VDVC _{cam} NST(I/L)GDFNDAR	99.62	61	LGDFNDAR <i>Zea mays</i> (100)
Proteínas de función desconocida				
Unnamed protein product	C _{cam} WQDVFW(I/L)TQGK	100	34	WRDVFWLT <i>Vitis vinifera</i> (87)
Unnamed protein product	M _{ox} KGQTNYAQSDYQRNM _{ox} K	95.33	34	NYAQTSYDQR <i>Vitis vinifera</i> (90)
Unnamed protein product	DFAQ(I/L)AEF(I/L)HR	99.87	0.23	DFAQIAEFLHR <i>Vitis vinifera</i> (90)
Unnamed protein product	DKPSFGVEASE(I/L)YPDVK	84.1	2e ⁻⁶	KPSFGVEASELYPDVK <i>Vitis vinifera</i> (100)
Unnamed protein product	EVSGEAGQQ(I/L)DKAYYK	99.26	7.8	VDGEAGQQLDK <i>Vitis vinifera</i> (90)
Unnamed protein product	FPGDTH(I/L)GADDFDNR	98.85	0.009	GDTHLGDDDFDNR <i>Vitis vinifera</i> (92)

Tabla 23. (Continuación) Proteínas identificadas mediante HPLC-MS/MS y secuenciación *de novo* en los polensomas de olivo.

Proteína	Secuencia peptídica <i>de novo</i>	Score (%)	Valor-e (BLAST)	Secuencias homólogas en otras especies (%)
Unnamed protein product	(I/L)PTN(I/L)GWR	99.96	15	LPTNLGWR <i>Vitis vinifera</i> (100)
Unnamed protein product	MPYQE(I/L)SE(I/L)AEQAK	99.57	1.3	YRELSEMAEQAK <i>Vitis vinifera</i> (83)
Unnamed protein product	VTSPDVYAVGVWTFP(I/L)K	93.69	0.41	TSVPDVYAVGDVATFPLK <i>Vitis vinifera</i> (83)
Unnamed protein product	TEDGVDN(I/L)FER	98.00	0.053	TEDGVDNLFER <i>Vitis vinifera</i> (100)
Unnamed protein product	VED(I/L)GALH(I/L)(I/L)PK	99.38	2.4	VEDIGALHLIPK <i>Vitis vinifera</i> (83)
Hypothetical protein	DMWSGGPVTGNTDGMNAK	93.81	81	MWSV-VTGYTGGMN <i>Oryza sativa</i> (66)
Hypothetical protein	QGDWFFRYR	100	135	WFFRYR <i>Oryza sativa</i> (100)
Hypothetical protein	GPF(I/L)AAEHNK	100	485	FLAAEHN <i>Vitis vinifera</i> (100)
Hypothetical protein	HVMKSNDV(I/L)NAR	76.82	149	MKSNDILDA <i>Vitis vinifera</i> (77)
Hypothetical protein	QRRYDKETWR	100	83	QRRY-ETWR <i>Vitis vinifera</i> (80)
Hypothetical protein	NMGKAVEVR	99.99	100	NMGKYAVEVR <i>Vitis vinifera</i> (90)
Hypothetical protein	VA(I/L)NTGG(I/L)(I/L)SSKTQMP(I/L)NK	82.90	7.7	VVL-GGLSSKKQLPTVWEQVLNK <i>Vitis vinifera</i> (56)
Hypothetical protein	(I/L)AAQADAGNTPVNVK	98.71	1.3	AAQADAGNTPNNTK <i>Nicotiana tabacum</i> (85)
Hypothetical protein	VAGG(I/L)VDENEFT	94.93	46	GGLVEENEFT <i>Zea mays</i>
Hypothetical protein OsJ_007152	A(I/L)GEQ(I/L)SNLEAQ(I/L)DTVR	77.26	2.4	ALGEQLSAEDEEAVMAEFENLEAQL <i>Oryza sativa</i> (52)
Hypothetical protein OsJ_012416	AT(I/L)GYDQST(I/L)NT(I/L)SM _{ox} NK	99.92	0.33	LGYDQRTLNTLS <i>Oryza sativa</i> (91)
Hypothetical protein Osl_029502	EGTTTRR(I/L)WR	97.10	34	GTTTLRRIR <i>Oryza sativa</i> (88)
Hypothetical protein OsJ_021719	DEWKSSPPEQVSQR	100	46	DEWKSSQPE <i>Oryza sativa</i> (88)
Hypothetical protein OsJ_032488	(I/L)AMGVQHD(I/L)(I/L)GVEAK	99.32	34	LALSVLHDLGLVAA <i>Oryza sativa</i> (71)
Hypothetical protein OsJ_008044	SPPAVDA(I/L)VKPVPNDK	80.84	4.3	AVSSDAAVKPVNPDA <i>Oryza sativa</i> (80)
Hypothetical protein Osl_031500	RWADGAVTYVVGVGYYGK	84.49	34	YIVGIGGYGK <i>Oryza sativa</i> (80)
Hypothetical protein Osl_032491	SRQHVNE(I/L)E(I/L)QNT(I/L)SK	99.99	10	HVNELE-ENTLS <i>Oryza sativa</i> (83)
Hypothetical protein OsJ_024412	TPPWQDT(I/L)C _{cam} DNK	100	111	WQDTLCD <i>Oryza sativa</i> (100)
Hypothetical protein Osl_018180	VFRNESGFNPM _{ox} HH(I/L)VER	94.63	19	RN-SGFSPKMDHLV <i>Oryza sativa</i> (71)
Hypothetical protein OsJ_007305	WTDVQYEVSEAPTR	76.33	34	DV-YEVSEAPTR <i>Oryza sativa</i> (83)
Hypothetical protein OsJ_011052	VYDRTAYYFNK	98.60	14	VYEDRSEYYFNK <i>Oryza sativa</i> (75)
Hypothetical protein Osl_39293	YQWDQYET(I/L)QKKGPMC _{cam} K	98.37	25	DQYETLQRK <i>Oryza sativa</i> (88)
Hypothetical protein OsJ_025879	VDQ(I/L)SEM(I/L)VPGR	100	26	VDQLTEMLV <i>Oryza sativa</i> (88)
Hypothetical protein OsJ_002739	WV(I/L)QDHEDDV(I/L)K	99.21	11	WVLQDHEPDD <i>Oryza sativa</i> (90)
Hypothetical protein Osl_13	YDYENVDAQK	98.68	2.4	YDYENVDAQ <i>Oryza sativa</i> (100)
Hypothetical protein 27.100104	SQRRVC _{cam} VR	100	189	SQRRCVR <i>Brassica oleracea</i> (100)
Otras proteínas				
Major olive pollen allergen Ole e 1*	AEG(I/L)YSM _{ox} (I/L)VER	99.99	0.053	AEGLYSMLVER <i>Olea europaea</i> (100)
	DQFC _{cam} E(I/L)T(I/L)(I/L)SSSR	99.84	0.55	NEFCEITLLSSSR <i>Olea europaea</i> (76)
Branched silkless1 (putative ERF-transcriptor factor)	F(I/L)APFHHTKR	99.45	149	FLAPFHH <i>Zea mays</i> (100)
CBF-like transcription factor	TNPEYN(I/L)TPSTR	83.20	62	TGPEYNLTP <i>Avena sativa</i> (88)
PHD finger family protein	YFNDGD(I/L)VWT(I/L)VK	100	2.4	NDGDLVWTL <i>Arabidopsis thaliana</i> (100)

Tabla 23. (Continuación) Proteínas identificadas mediante HPLC-MS/MS y secuenciación *de novo* en los polensomas de olivo.

Proteína	Secuencia peptídica <i>de novo</i>	Score (%)	Valor-e (BLAST)	Secuencias homólogas en otras especies (%)
Sulfotransferase family protein	VSGT(I/L)WLK	98.20	390	SGTLWLK <i>Arabidopsis thaliana</i> (100)
T2E6.21	MPTK(I/L)GS(I/L)VQRQ(I/L)SSSK	99.49	14	MNTFFKLGSLIQRASQISSS <i>Arabidopsis thaliana</i> (61)
WERBP-1	RED(I/L)GN(I/L)K	89.89	390	REDLGNL <i>Nicotiana tabacum</i> (100)
RHM1	EEDTPNF(I/L)GSFYK	99.99	6e ⁻⁴	EEDTPNFIGSFYK <i>Zea mays</i> (100)
Hypothetical chloroplast RF1	QWWG(I/L)S(I/L)VSYGK	87.70	34	WWGLR-VSYGK <i>Pelargonium x hortorum</i> (81)

(*) Proteínas descritas como alérgenos. C_{cam}, cisteínas carbamidometiladas. M_{ox}, metioninas oxidadas. I/L, isoleucina y leucina con la misma masa mosoisotópica.

Polensomas, un nuevo mecanismo de liberación de alérgenos

La presencia de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 9, Ole e 11 y Ole e 12 en los polensomas de olivo fue analizada mediante *Western blot*, empleando anticuerpos específicos (**Figura 52**). Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de Ole e 1, Ole e 11 y Ole e 12 en los polensomas de olivo, identificados mediante proteómica. Además, se detectó la presencia de Ole e 3, sin embargo, no se detectaron Ole e 2 ni Ole e 9.

El alérgeno Ole e 3 es una proteína de unión a calcio específica de polen, perteneciente a la familia de las polcalcinas [Batanero *et al.*, 1996b; Ledesma *et al.*, 1998b]. Esta familia de proteínas se pueden clasificar, según la nomenclatura propuesta por Hauser *et al.* [2010], como euralérgenos. Esta clasificación se refiere a que son alérgenos que presentan una elevada reactividad cruzada y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pero no son ubicuos. Es decir, las polcalcinas al ser proteínas específicas de polen sólo se encuentran implicadas en fenómenos de reactividad cruzada entre pólenes, ya sea de especies relacionadas o no filogenéticamente [Ledesma *et al.*, 1998b; Wopfner *et al.*, 2007; Hauser *et al.*, 2010]. El hecho de que Ole e 3 haya sido detectado mediante *Western blot*, pero no en los estudios proteómicos pone de manifiesto las limitaciones de esta técnica. Estas limitaciones son debidas, principalmente, a que esta técnica es altamente dependiente de la naturaleza de la proteína -ya que ciertos péptidos se pueden perder- y sólo son identificadas empleando otras metodologías más sensibles como la inmunodetección con anticuerpos específicos o ensayos enzimáticos [Garbis *et al.*, 2005; Baik *et al.*, 2008; Kienzl-Wagner *et al.*, 2012].

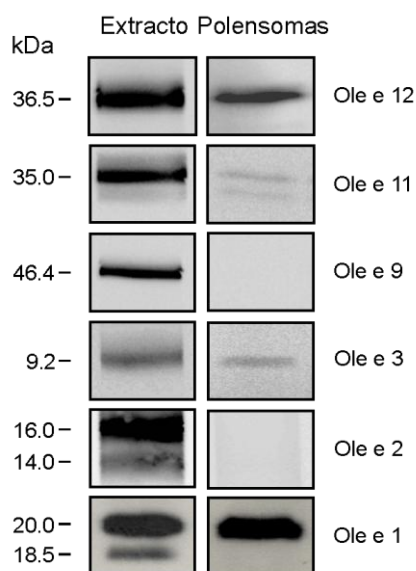


Figura 52. Western blot de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 9, Ole e 11 y Ole e 12 en los polensomas de olivo, empleando anticuerpos específicos. Los polensomas (50 µg) se transfirieron a membranas de nitrocelulosa tras PAGE-SDS al 15%. Como control positivo se utilizó extracto de polen de olivo (30 µg). Las masas moleculares de los alérgenos se muestran en kDa.

Varios estudios han descrito la presencia de profilinas tanto en exosomas derivados de varias líneas celulares y fluidos biológicos de humanos, como de líneas celulares de ratón y de rata [Théry *et al.*, 2001; Pisitkun *et al.*, 2004; Admyre *et al.*, 2007b; Buschow *et al.*, 2010; Carayon *et al.*, 2011]. Sin embargo, no se ha detectado la presencia de Ole e 2, profilina del olivo, en los polensomas ni mediante experimentos de *Western blot* ni mediante proteómica. Las profilinas se pueden encontrar en todas las células eucariotas y están implicados en procesos relacionados con la motilidad celular a través de la

unión a polímeros de actina [Valenta *et al.*, 1992]. En las células vegetales las profilinas juegan un papel importante en la citocinesis, la transducción de señales, la elongación de las células, así como en el crecimiento del tubo polínico y de las raíces [Valster *et al.*, 1997; Ramachandran *et al.*, 2000; Witke, 2004]. Las profilinas son panalérgenos, es decir, son alérgenos ubicuos que están implicadas en los fenómenos de reactividad cruzada entre pólenes y alimentos [Valenta *et al.*, 1992; Ledesma *et al.*, 1998a; Asero *et al.*, 2008; Sirvent *et al.*, 2011]. El hecho de que Ole e 2 no se haya detectado en los polensomas de olivo podría deberse a que el alérgeno es liberado del grano de polen por difusión rápida tras la hidratación, como se ha descrito para la profilina de abedul, Bet v 2 [Grote *et al.*, 1993].

Para descartar la posibilidad de que los alérgenos fuesen proteínas contaminantes -y no constituyentes de los polensomas- como consecuencia del proceso de purificación, se llevaron a cabo distintos análisis.

Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa

La colocación de los alérgenos con los polensomas se llevó a cabo mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa y análisis mediante *Dot blot* de cada una de las fracciones obtenidas, empleando anticuerpos específicos frente a Ole e 1, Ole e 11 y Ole e 12 (**Figura 53**). Los tres alérgenos se detectaron en la fracción 5, cuya densidad comprendida entre 1.24 g/ml y 1.29 g/ml, corresponde a la determinada para los polensomas.

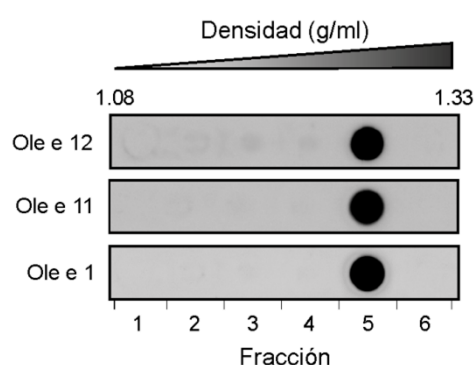


Figura 53. Localización en los polensomas de los alérgenos Ole e 1, Ole e 11 y Ole e 12 tras ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante *Dot blot*, tras la aplicación de los polensomas (50 µg) en membranas de nitrocelulosa.

Inmunolocalización de Ole e 1 y Ole e 12 en los polensomas mediante TEM

Una vez demostrada la colocación de los alérgenos con los polensomas, el siguiente paso en el presente estudio fue analizar su inmunolocalización en dichas vesículas mediante TEM (**Figura 54**). Los ensayos de inmunolocalización sobre los polensomas se llevaron a cabo empleando los anticuerpos específicos frente a Ole e 1 y Ole e 12, y un anticuerpo secundario marcado con partículas de oro. Estos experimentos confirmaron la presencia de los alérgenos Ole e 1 y Ole e 12 en los polensomas, a la vez que indicaron el carácter heterogéneo de la carga proteica. Además, se observó que el marcaje específico para Ole e 12 era más abundante que para Ole e 1. La especificidad de marcaje fue confirmada por la ausencia de partículas de oro en los controles, en los cuales se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

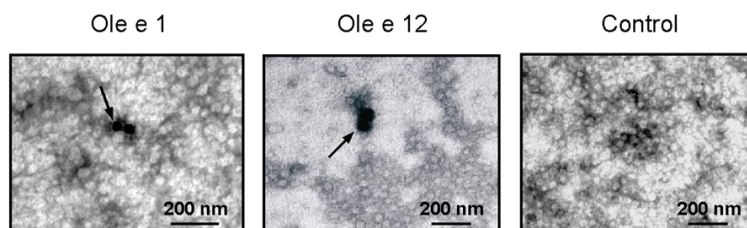


Figura 54. Inmunolocalización de Ole e 1 y Ole e 12 en los polensomas mediante TEM, empleando anticuerpos específicos. En el control se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Las flechas indican las partículas de oro.

Estos estudios constituyen la primera evidencia de que los alérgenos son liberados en el contexto de nanovesículas, denominadas polensomas, que son secretadas por el polen durante el proceso de germinación *in vitro*. Además, estos resultados indican que Ole e 1 y Ole e 12 pueden ser empleados como marcadores de polensomas de olivo.

Inmunolocalización de Ole e 12 en el grano de polen maduro y germinado

Una vez determinada la presencia de Ole e 12 en los polensomas, el siguiente paso en el presente estudio fue determinar la localización de este alérgeno en el grano de polen maduro y germinado, y poder obtener datos sobre el posible origen subcelular de los polensomas. Con este fin, el polen de olivo se germinó durante 8 h *in vitro* y se llevaron a cabo estudios de inmunolocalización con partículas de oro mediante TEM (**Figura 55**) y con anticuerpos marcados con fluorescencia para CLSM (**Figura 56**). Se empleó Ole e 12 como marcador de polensomas.

El estudio de la inmunolocalización de Ole e 12 mediante TEM en el grano de polen y en el tubo polínico, demostró que el alérgeno se encontraba, principalmente, en el interior de estructuras de naturaleza vesicular con un tamaño heterogéneo comprendido entre 200-600 nm de diámetro (**Figura 55**). Este tamaño concordaría con lo descrito para los MVB, compartimento donde tiene lugar la biogénesis de los exosomas [Futter *et al.*, 1996; Murk *et al.*, 2002; Stoorvogel *et al.*, 2002]. Sin embargo, no se pudieron detectar vesículas de tamaño similar a los polensomas (28-60 nm) dentro de estos compartimentos. Esto podría ser debido al tipo de técnica empleada, puesto que determinados análisis ultraestructurales requieren métodos especializados de preparación de las muestras. En este sentido, Wang *et al.* [2010c] han desarrollado una nueva técnica, empleando secciones ultrafinas congeladas a alta presiones en *Arabidopsis thaliana*, para describir un nuevo tipo de orgánulos denominados EXPOs (*Exocyst-Positive Organelles*). Esta técnica representa un método especializado de preparación, útil en particular, para el análisis de este tipo de estructuras. De esta forma, el empleo de otras metodologías más específicas podría esclarecer el origen subcelular de los compartimentos vesiculares que contienen Ole e 12. En plantas se han sugerido dos vías principales para la biogénesis de exosomas: MVB y EXPOs. Los MVB tienen unas características ultraestructurales bien definidas y se parecen a sacos membranosos con un tamaño comprendido entre los 200-800 nm [Futter *et al.*, 1996; Murk *et al.*, 2002; Hanson & Cashikar, 2012]. Los EXPOs también son estructuras con doble membrana, comparables en tamaño a los MVB, aunque presentan diferente morfología [Wang *et al.*, 2010c; Ding *et al.*, 2012]. Este

sistema representa una nueva vía de secreción de vesículas única en plantas, ya que al fusionarse con la membrana plasmática también liberan exosomas, aunque con un origen subcelular diferente al de las células animales. El tamaño descrito tanto para los MVB como para los EXPOs concordaría con el observado en el presente estudio de inmunolocalización mediante TEM para los compartimentos vesiculares que contienen Ole e 12. Sin embargo, habría que confirmarlo mediante el uso de marcadores específicos de estos compartimentos.

Ole e 12 también se localiza en el citoplasma de la célula vegetativa y en el del tubo polínico. Frecuentemente, se detectaron partículas de oro cerca de la membrana plasmática del grano de polen y en la capa interna de la pared celular (intina) (**Figura 55A-55F**, flechas dobles). Además, se pudo observar una acumulación de partículas de oro cerca de la región de la apertura en el grano de polen (**Figura 55D**). Esta localización de Ole e 12 indicaría un posible papel para esta enzima, en los procesos de germinación y/o hidratación. Esta hipótesis concordaría con lo observado en pistilos de la patata (*Solanum tuberosum*), donde se observó el aumento de la expresión del gen de una proteína homóloga a IFR, provocado por el crecimiento del tubo polínico tras la polinización [van Eldik *et al.*, 1997]. No se detectó marcaje para Ole e 12 en otros compartimentos internos, como plastidios o mitocondrias. En el control negativo, donde se omitió la incubación con el anticuerpo primario, raramente se detectó alguna partícula de oro unida de forma no específica (**Figura 55E**).

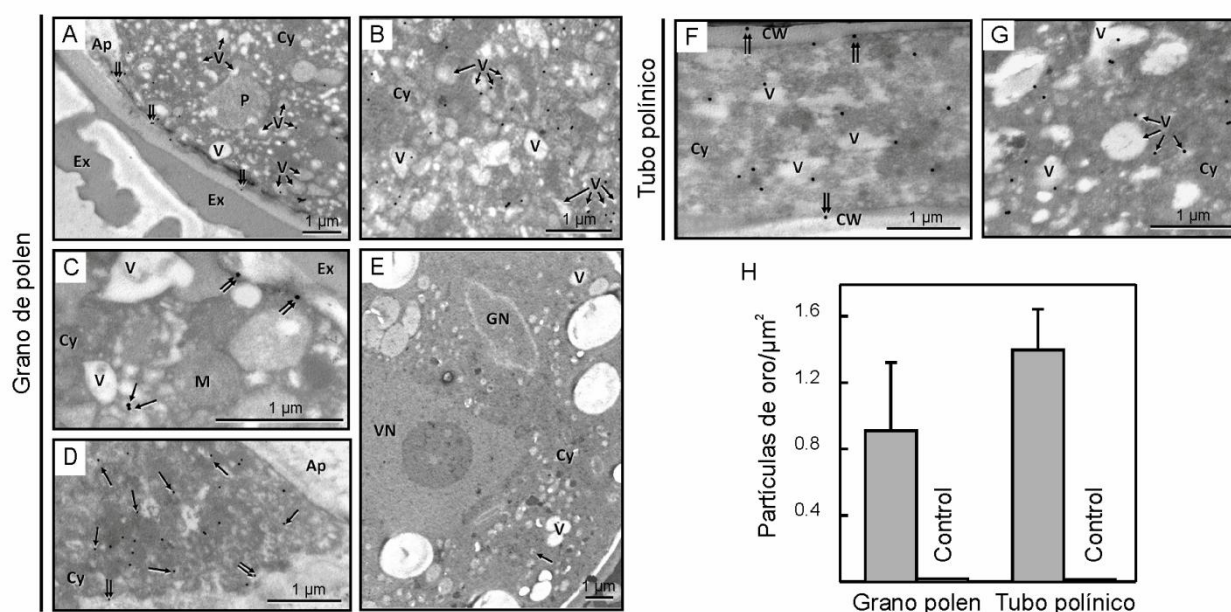


Figura 55. Inmunolocalización de Ole e 12 mediante TEM en el grano de polen maduro y germinado. (A-E) Micrografías del grano de polen maduro y germinado, y (F-G) detalle del tubo polínico. Las flechas sencillas señalan la localización de Ole e 12 (partículas de oro) y las dobles señalan la presencia de vesículas marcadas cerca de la pared celular. (E) Control negativo. (H) Densidad de marcaje (número de partículas de oro/ μm^2) en los granos de polen y en los tubos polínicos. Ap, apertura; Cy, citoplasma; CW, pared celular; Ex, exina; GN, núcleo generativo; M, mitocondria; P, plastidio; V, vesícula; y VN, núcleo vegetativo.

La síntesis de Ole e 1 tiene lugar en el lumen del retículo endoplasmático [Alché *et al.*, 1999; Alché *et al.*, 2004], mientras que la PME y las pectinas se sintetizan en el aparato de Golgi [Li *et al.*, 2002; Bosch *et al.*, 2005]. Además, los datos presentados en la presente tesis demuestran que Ole e 12

se localizaba en compartimentos vesiculares que podrían corresponder, según su tamaño, con EXPOs o MVB. Estos resultados sugieren que tanto la vía de secreción convencional o clásica -retículo endoplasmático/aparato de Golgi/*Trans-Golgi network*- como la no convencional o alternativa -MVB o EXPOs- podrían estar implicadas en la biogénesis de los polensomas. Esto parece indicar que los polensomas comprenden una población heterogénea de NVS en cuanto a su origen subcelular y composición. Así, habría vesículas derivadas del aparato de Golgi, como las que contienen pectinas y PME y vesículas del retículo endoplasmático, que contienen Ole e 1. Además, no se ha descartado que algunas sean vesículas *exosoma-like*, como las que tienen por carga Ole e 12.

Los estudios de inmunolocalización de Ole e 12 mediante CLSM se realizaron sobre cortes de grano de polen maduro y germinado *in vitro* durante 8 h, empleando como anticuerpo específico de Ole e 12 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (detectado como fluorescencia verde) (**Figura 56A/A'-H/H'**). El análisis de las micrografías revelaba que Ole e 12 se localizaba principalmente en la región apical y subapical del tubo polínico, así como en la exina del grano de polen. Las imágenes detalladas del ápice del tubo polínico (**Figura 56C'-56H'**) mostraron que el alérgeno se encontraba en orgánulos de forma redondeada y pequeño tamaño, ampliamente distribuidos en el citoplasma, cerca de la pared celular del tubo polínico y, ocasionalmente, en el exterior de la célula (flecha roja doble) (**Figura 56C', 56D' y 56H'**). El control, en el que se omitió la incubación con el anticuerpo primario, no mostró fluorescencia significativa (**Figura 56B-56B'**).

El marcaje de Ole e 12 detectado en la región subapical y apical del tubo, así como en la exina del grano, concordaba con la posible implicación del alérgeno en los eventos del crecimiento del tubo polínico. Además, la presencia de partículas fluorescentes fuera del tubo polínico sugería su posible exocitosis. Esta inmunolocalización de Ole e 12 coincide con la de Ole e 1, ya que mediante CLSM se observó que se localizaba tanto en la exina como en la región subapical y apical del tubo emergente [Alché *et al.*, 2004]. Además, los autores detectaron la presencia de Ole e 1 fuera del tubo polínico tras 2-8 h de cultivo. Estos resultados sugieren que los alérgenos Ole e 1 y Ole e 12, marcadores de polensomas de olivo, son excretados del tubo polínico, donde podrían jugar un papel importante en el proceso de germinación del grano de polen.

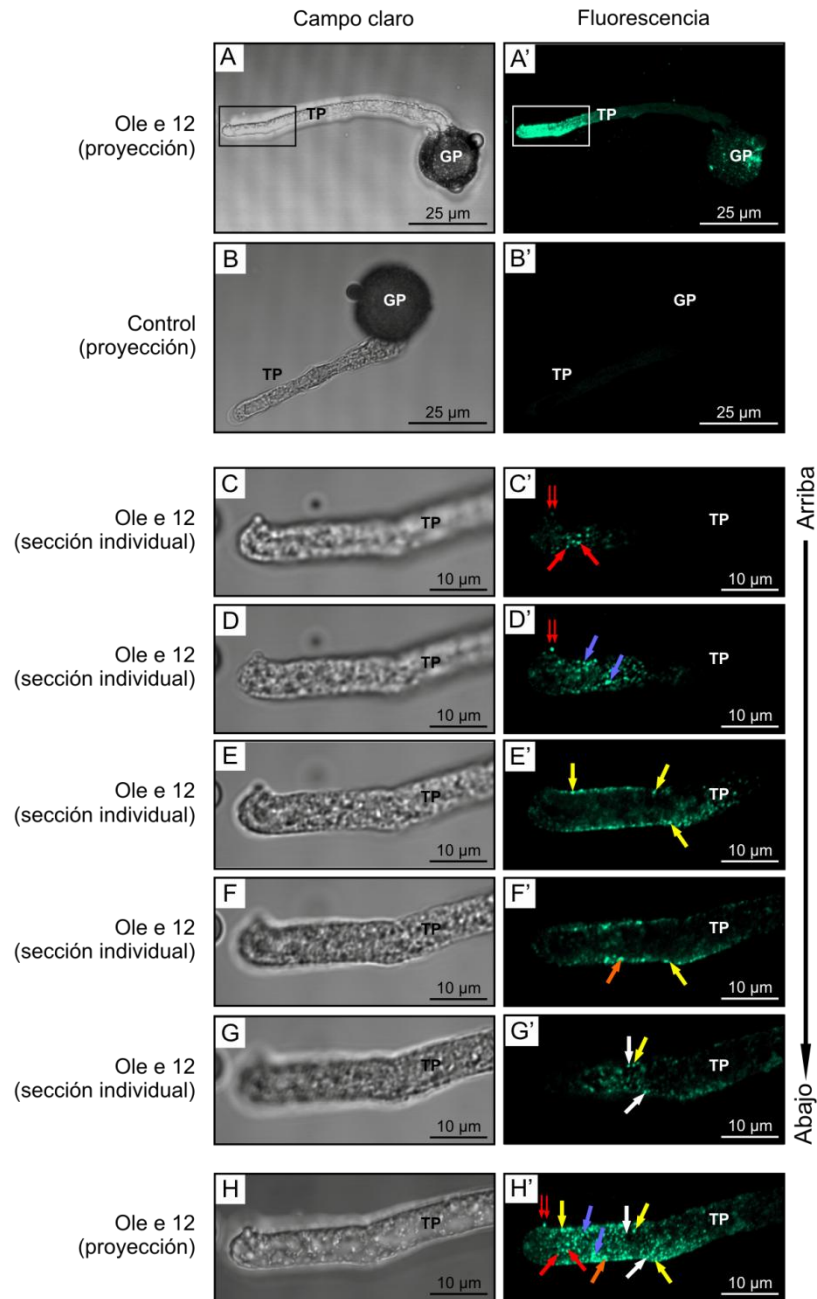


Figura 56. Immunolocalización de Ole e 12 mediante CLSM en los granos de polen maduro y germinado. Micrografías de campo claro (A-H) y de emisión de fluorescencia (A'-H') de los granos de polen y del tubo polínico, obtenidas mediante CLSM, tras 8 h de germinación. (A'-B') Proyección de secciones individuales del grano de polen y del tubo polínico. (C/C'-G/G') Secciones individuales del detalle de la región apical del tubo polínico indicado con un recuadro en A/A'. (H-H') Proyección de la serie de imágenes C/C'-G/G'. (B-B') Control negativo. Las flechas de colores muestran partículas individuales. Nótese la presencia de una partícula fluorescente fuera del tubo polínico (flecha roja doble). GP, grano de polen; TP, tubo polínico.

Los polensomas son secretados tras la hidratación y el crecimiento del tubo polínico

Con el fin de estudiar la cinética de liberación de los polensomas a lo largo del proceso de germinación *in vitro*, se analizó la presencia de polensomas a distintos tiempos (0, 1, 4, 8, 16 y 32 h) mediante TEM y *Dot blot*, simultáneamente (Figura 57). Además, el proceso de germinación y crecimiento del tubo polínico se evaluó mediante visualización al microscopio óptico a lo largo del tiempo

(Figura 57A y B). El mayor porcentaje de germinación del polen ($51 \pm 14\%$) se alcanzó a las 16 h de cultivo, momento en el que los tubos eran unos $314 \pm 89 \mu\text{m}$ de largo. No se observó un incremento significativo en el porcentaje de germinación ($54.5 \pm 10.5\%$), ni en la longitud del los tubos polínicos ($314 \pm 85 \mu\text{m}$) a las 32 h. Sin embargo, a ese tiempo los granos de polen mostraban evidencias de degeneración caracterizadas por el engrosamiento de la región apical del tubo y el “estallido” del mismo en dicha región, liberándose pequeñas partículas y material amorfo (Figura 57A, 32 h).

La cinética de liberación de los polensomas a lo largo del proceso de germinación *in vitro* se analizó mediante *Dot blot*, empleando los anticuerpos específicos frente a los alérgenos Ole e 1, Ole e 11 y Ole e 12, y pectinas desesterificadas (JIM7) (Figura 57C). Se analizó de forma independiente la secreción de polensomas durante la germinación y la hidratación mediante un lavado previo de los granos de polen hidratados con agua. Los polensomas, identificados por la señal positiva para los 3 alérgenos y la pectina desesterificada, se detectaron exclusivamente a las 16 h de germinación. Dicho tiempo coincidía en el cultivo con un elevado porcentaje de granos de polen germinados. Es importante mencionar, que los polensomas no se detectaron a las 32 h de cultivo, momento en el que coincide un elevado porcentaje de tubos con el ápice “estallado” (60%), en comparación con el 26% a las 16 h de germinación. Durante los estadios finales del crecimiento del tubo polínico se requiere una gran comunicación entre el gametófito masculino (polen) y el femenino para la correcta liberación de las células espermáticas [Dresselhaus *et al.*, 2011]. Cuando las células espermáticas alcanzan el saco embrionario el crecimiento del tubo se para y éste “estalla” liberándolas dentro de la célula sinérgida receptiva. En el caso de la germinación *in vitro* no tiene lugar la fecundación, por lo que cuando el tubo polínico alcanza un determinado tamaño “estalla” liberando todo su contenido. En el caso del polen de abedul, se ha observado que durante este proceso se pueden llegar a liberar más de 400 gránulos de almidón [Schäppi *et al.*, 1999b]. Posiblemente, los polensomas se liberen a lo largo de todo el proceso de germinación, como evidencian las micrografías mediante TEM de las muestras obtenidas a diferentes tiempos (datos no mostrados). Sin embargo, sólo se detectaron mediante *Dot blot* a las 16 h, cuando hay un elevado número de granos de polen germinados y un bajo porcentaje de tubos con el ápice “estallado”. También se detectó marcaje positivo para las pectinas desesterificadas en las etapas iniciales de la germinación (0 y 1 h), desapareciendo tras 4 h de germinación (Figura 57C). Esto podría ser debido a restos contaminantes de polensomas liberados durante el proceso de hidratación que posteriormente podrían ser endocitados. El tráfico de vesículas (endocitosis/exocitosis) durante la germinación del grano de polen es un evento crucial para el mantenimiento de la polaridad de la membrana plasmática, así como para el crecimiento del tubo polínico [Parton *et al.*, 2003; Zonia, 2010; Zonia & Munnik, 2011]. Además, la internación de pectinas se ha observado en algunas células somáticas vegetales [Baluska *et al.*, 2002; Baluska *et al.*, 2005] y se ha citado como modelo teórico para explicar el crecimiento oscilatorio del tubo [Kroeger *et al.*, 2008]. También, se ha observado que vesículas con material fibrilar están implicadas en la internación de nanopartículas de oro en tubos de tabaco [Moscatelli *et al.*, 2007].

Para confirmar que los polensomas son secretados durante la hidratación del polen, el agua procedente del lavado de los granos hidratados se sometió al protocolo de purificación de NVS. Los polensomas secretados durante la hidratación se analizaron mediante *Dot blot* y TEM, y se compararon con los polensomas secretados durante la germinación (Figura 57C y D). El análisis mediante *Dot blot*,

empleando anticuerpos específicos, confirmó que los polensomas secretados durante la hidratación contienen los alérgenos Ole e 1, Ole e 11 y Ole e 12 (**Figura 57C**). El análisis mediante TEM reveló que los polensomas secretados tras la hidratación presentaban forma redondeada y un tamaño comprendido entre 30-60 nm, lo que concordaría con lo observado para los polensomas secretados durante la germinación (**Figura 57D**). El porcentaje de liberación de polensomas tras la hidratación representaría el 60% del total, en comparación con los secretados durante la germinación (40% del total). En la antera, los granos de polen son quiescentes y se encuentran altamente deshidratados. Sin embargo, cuando los granos de polen se hidratan, se produce una fuerte activación metabólica [Breigina *et al.*, 2012]. Esta activación conlleva la secreción de una gran cantidad de material citoplasmático que podría explicar el mayor porcentaje de liberación de polensomas durante la hidratación que durante la germinación. Durante el proceso de hidratación también se produce la liberación de diferentes partículas citoplasmáticas, tales como gránulos de almidón y partículas-P. Para evitar posibles contaminaciones cruzadas se introdujo la etapa de lavado tras la hidratación y se trabajó con los polensomas secretados durante el proceso de elongación del tubo polínico.

Para analizar la asociación entre la liberación de polensomas y la capacidad germinativa del grano de polen *in vitro*, se realizó el estudio cinético con polen fresco en comparación con polen de olivo almacenado a -20°C durante un periodo de tiempo superior a 5 años (**Figura 57E**). En este estudio, el polen no se lavó con agua tras la hidratación. En general, el polen almacenado no germinaba, observándose raramente algún grano germinado entre las 16 h y 32 h. En todos los casos el porcentaje de germinación fue significativamente menor del 1% (**Figura 57B**). El análisis mediante *Western blot*, empleando un anticuerpo específico frente a Ole e 12 como marcador de polensomas, reveló que sólo el polen fresco secretaba nanovesículas durante la hidratación (0 h) y el crecimiento del tubo polínico (8 y 16 h), confirmando el carácter cíclico de la exocitosis/endocitos de los polensomas durante la germinación. El polen almacenado no secretaba polensomas al medio de germinación *in vitro*, en cantidades significativas como para poder ser detectados mediante *Western blot*. Está bien establecido que la germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico depende de varios factores, incluyendo el tiempo y las condiciones de almacenaje del polen y de las especies. Así, por ejemplo, varios estudios han observado que el polen de abedul [Taylor *et al.*, 2004], el de gramíneas [Grote *et al.*, 2001] o el de *Arabidopsis thaliana* [Bou Daher *et al.*, 2009] almacenado a temperatura ambiente, durante periodos superiores a 1 mes, pierden la capacidad de expulsar material citoplasmático. En consecuencia, dichos factores también afectarán a la liberación de los polensomas, como han indicado nuestros resultados. Este estudio confirma que la secreción de polensomas depende de la capacidad germinativa del polen, y en consecuencia, de diferentes factores ambientales, tales como la temperatura y el tiempo de almacenaje.

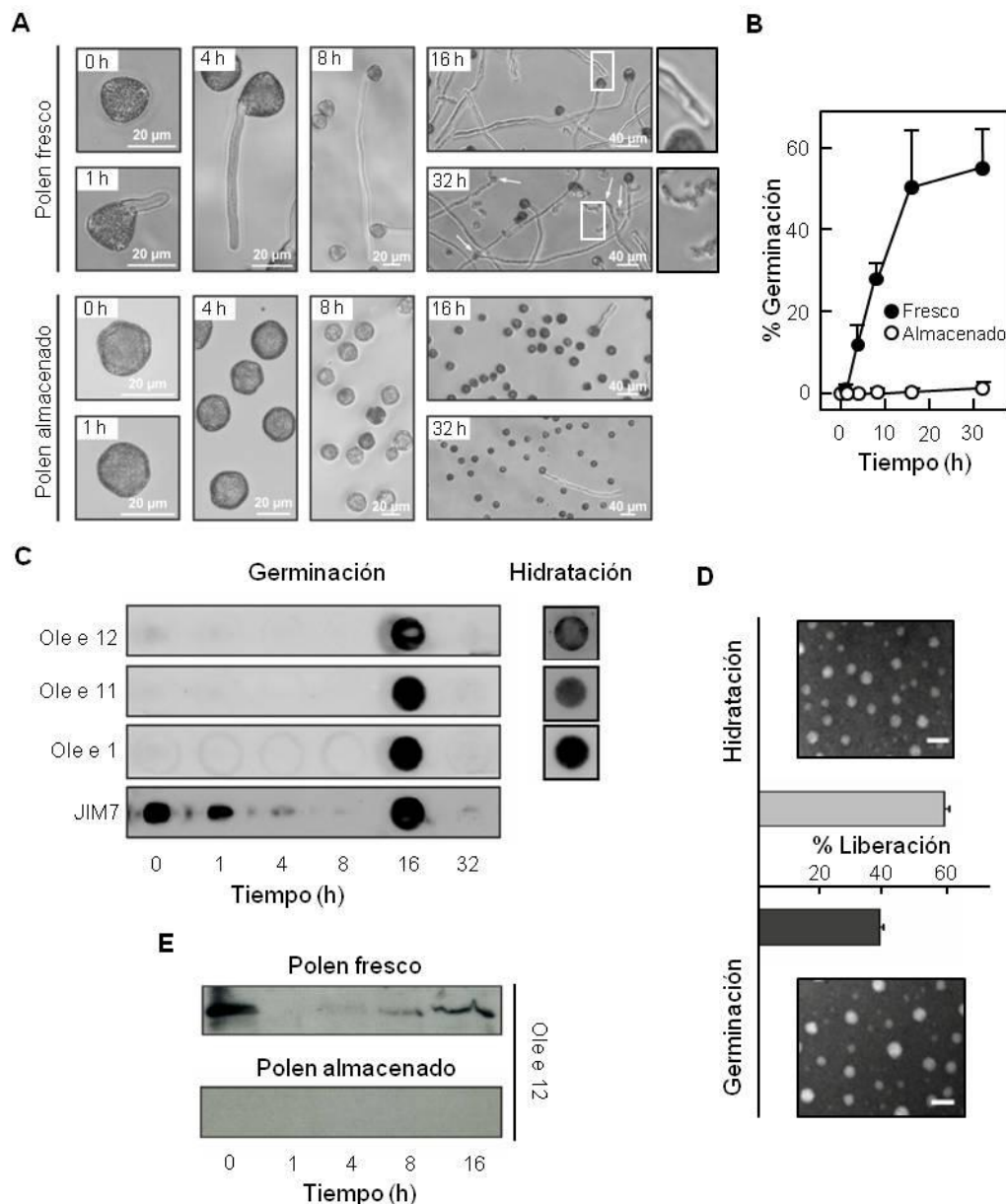


Figura 57. Estudio de la cinética de liberación de los polensomas *in vitro*. (A) Micrografías ópticas de los granos de polen tomadas a distintos tiempos de germinación (0, 1, 4, 8, 16 y 32 h). Se muestra el polen fresco en comparación con el polen almacenado. A las 32 h, las flechas señalan los tubos polínicos con el ápice engrosado y la liberación de material amorfo. A la derecha se muestra el detalle de los ápices de un tubo normal (16 h) y otro "estallado" (32 h), indicados por un recuadro blanco. (B) Porcentaje de germinación del polen fresco en comparación con el almacenado, a diferentes tiempos de germinación. Los valores corresponden a la media \pm SD de 2 experimentos independientes ($n=1.400-3.000$ granos de polen por tiempo, en un total de 10 imágenes tomadas al azar). (C) Dot blot de la cinética de liberación de polensomas durante la germinación y la hidratación, empleando los anticuerpos frente a Ole e 1, Ole e 11, Ole e 12 y JIM7. (D) Porcentaje de liberación de polensomas durante el proceso de germinación (tras 16 h) y de la hidratación, determinado mediante cuantificación de proteína total, y sus correspondientes micrografías mediante TEM (las barras blancas corresponden a 100 nm). (E) Análisis de la asociación entre la liberación de polensomas y la capacidad germinativa del polen. Western blot de los polensomas secretados por el polen fresco (sin prelavado) y el polen almacenado a diferentes tiempos de germinación (0, 1, 4, 8 y 16 h), empleando un anticuerpo específico frente a Ole e 12.

Los polensomas juegan un papel activo en la alergia

Dado que los polensomas contienen alérgenos el siguiente paso en el presente estudio fue analizar su relevancia clínica mediante diferentes abordajes.

Estudio in vitro de la unión de IgE de pacientes alérgicos a polensomas

La capacidad de unión de anticuerpos IgE de pacientes alérgicos se determinó mediante *Western blot* empleando 2 sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo (**Figura 58**). El alergograma de los polensomas -o patrón de bandas proteicas reconocidas por las IgE- era diferente para cada uno de los sueros ensayados, lo que revela la heterogeneidad del contenido proteico en los mismos. Las IgE reconocían, en los polensomas, proteínas con masas moleculares comprendidas entre 9-70 kDa con distinta intensidad. Ambos sueros contenían anticuerpos IgE que reaccionaban con proteínas de masas moleculares aparentes de 20 kDa y 10 kDa, que podrían corresponder a Ole e 1 y a Ole e 3, respectivamente. Además, se pudo observar que reconocían otras proteínas de masas moleculares aparentes de 35-40 kDa que podrían corresponder a Ole e 11 y/o Ole e 12. Los anticuerpos IgE también reaccionaban con otras proteínas de masa molecular mayor o igual a 50 kDa, indicando la presencia de otros alérgenos del olivo no identificados hasta la fecha. Todas estas bandas reactivas a las IgE fueron detectadas, también, en el extracto del polen de olivo. No obstante, el alergograma de los polensomas exhibía una complejidad mucho menor que la observada para el extracto de polen. No se detectó ninguna banda IgE reactiva cuando se empleó el suero de un individuo no atópico (Control).

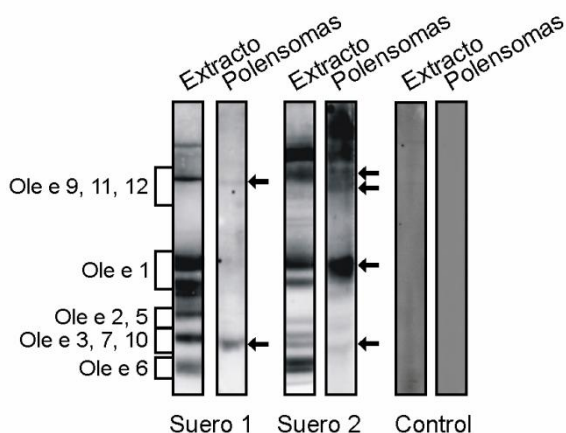


Figura 58. Reactividad de las proteínas que unen IgE en los polensomas, analizada mediante *Western blot* con sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo. Patrones de unión de IgE en los polensomas (50 µg) tras PAGE-SDS al 15% y transferencia a membranas de nitrocelulosa en condiciones no reductoras, en comparación con los del extracto de polen de olivo (30 µg). Las flechas indican la posición de las bandas IgE reactivas en los polensomas. Se indica, a la izquierda, la movilidad electroforética de los alérgenos del polen de olivo identificados hasta la fecha. Como control se empleó el suero de un paciente no atópico.

Estudio de activación de basófilos in vitro

La actividad alérgica de los polensomas *in vitro* también se analizó mediante un ensayo de desgranulación (activación) de basófilos procedentes de 4 pacientes alérgicos al polen de olivo. La activación de basófilos se determinó mediante citometría de flujo, en función de los niveles de expresión de la proteína CD63 [De Week *et al.*, 2008]. Las curvas dosis-respuesta se muestran en la **Figura 59**. Como control se emplearon células sanguíneas aisladas de 2 individuos no atópicos.

Los polensomas inducían la desgranulación de los basófilos de una manera similar a la de Ole e 1 y dependiente de dosis en los 4 pacientes ensayados. Por otra parte, no se observó activación cuando los basófilos procedentes de individuos no atópicos se incubaron con los polensomas o con Ole e 1. El

porcentaje de activación de las células efectoras por los polensomas era inferior al inducido por Ole e 1, en todos los casos ensayados. Además, los niveles de activación de basófilos obtenidos variaban entre los pacientes ensayados, lo que confirmaba, una vez más, diferencias entre individuos en la respuesta frente a los polensomas y Ole e 1. Esta heterogeneidad también ha sido descrita para otros alérgenos y extractos alérgénicos [Sanz *et al.*, 2006; Gamboa *et al.*, 2007]. Así, el estudio llevado a cabo por Gamboa *et al.* [2007] puso de manifiesto que el porcentaje de activación de basófilos de pacientes alérgicos al melocotón dependía del tipo de reacción -sistémica o síndrome oral- que presentaban. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que los polensomas son capaces de inducir la desgranulación de basófilos *in vitro*.

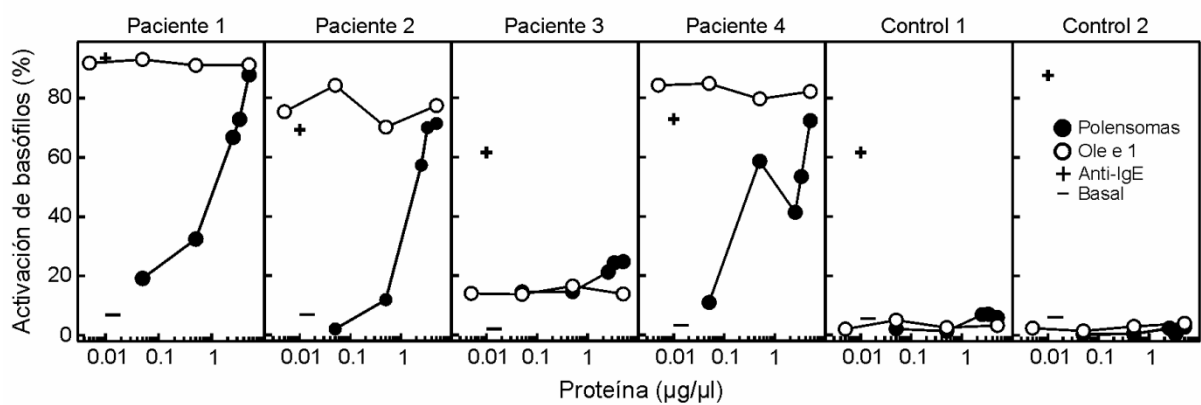


Figura 59. Curvas de dosis-respuesta de la desgranulación de basófilos de pacientes alérgicos al polen de olivo inducidas por los polensomas. Los basófilos se estimularon *in vitro* con concentraciones crecientes de polensomas o de Ole e 1 en el rango de 25 a 0.25 µg/ml. Los resultados se expresaron como porcentaje de expresión de CD63, evaluado mediante citometría de flujo. Como controles positivo (+) y negativo (-) se emplearon, respectivamente, anti-IgE y PBS (expresión basal).

Pruebas cutáneas en pacientes alérgicos

Por último, se evaluó la capacidad de los polensomas de provocar una reacción cutánea positiva en 4 pacientes alérgicos al polen de olivo (**Tabla 24**). Para asegurar la especificidad de la respuesta en la prueba, se incluyeron en el estudio 2 individuos no atópicos.

Tabla 24. Pruebas cutáneas con polensomas y extracto de polen, en pacientes alérgicos al polen de olivo.		
	Polensomas	Extracto de polen
Paciente 1	17.5	30.0
Paciente 2	18.0	38.0
Paciente 3	4.0	8.0
Paciente 4	7.0	12.0
Control 1*	0.0	0.0
Control 2*	0.0	0.0
Los resultados fueron expresados en mm ² .		
*Pacientes no atópicos utilizados como control.		

Los 4 pacientes mostraron una reacción positiva a la prueba cutánea, tanto para los polensomas como para el extracto de polen de olivo. Sin embargo, la reacción inducida por los polensomas fue menor a la obtenida para el extracto en los 4 pacientes incluidos en el estudio. El área media de la pápula con eritema inducida por los polensomas fue de 11.63 mm² y la del extracto fue de 22 mm². Este resultado se puede explicar por diferencias en el contenido molecular entre los polensomas y el extracto de polen. El hecho de que las pruebas cutáneas resultasen positivas manifiesta la presencia de anticuerpos IgE específicos, en los pacientes seleccionados, para los componentes moleculares de los polensomas.

En conclusión, los datos obtenidos en estos estudios demuestran que los polensomas son capaces de unir IgEs de pacientes alérgicos y activar basófilos *in vitro*, así como de provocar una prueba cutánea positiva *in vivo*. Los resultados confirman la actividad alérgica -definida como la capacidad de unir anticuerpos IgE- de los polensomas y sugieren la posible relevancia clínica de los polensomas en las reacciones alérgicas, tanto en la etapa de sensibilización como en la sintomatología clínica.

Polensomas, vehículos de alérgenos en especies no relacionadas filogenéticamente. Implicación en fenómenos de reactividad cruzada

Para poder generalizar sobre el mecanismo de la liberación de alérgenos en el contexto de polensomas, se evaluó la secreción de éstos en especies no relacionadas filogenéticamente con el olivo y con relevancia clínica en alergología (**Figura 60**). Las especies seleccionadas para el estudio fueron: abedul (*Betula verrucosa*), representante de especies arbóreas y principal fuente alérgica en Europa Central [Movérare *et al.*, 2002]; ballico (*Lolium perenne*), de la familia de las gramíneas como representante de herbáceas e importante fuente alérgica a nivel mundial [Andersson *et al.*, 2003; Weber, 2004]; y pino (*Pinus sylvestris*), como especie representante de gimnospermas. Aunque la alergia al polen de pino es poco frecuente -estando asociada, generalmente, a zonas de de plantaciones intensivas [Gastaminza *et al.*, 2009]- es importante a nivel clínico por la severidad de los síntomas que desencadena [Douwes *et al.*, 2006]. Los polensomas fueron aislados a partir del medio de germinación de los granos de polen de las diferentes especies seleccionadas. Los protocolos de germinación *in vitro* fueron optimizados para cada una de las especies incluidas en el estudio.

El análisis mediante TEM demostró que las 3 especies de pólenes secretaban al medio extracelular nanovesículas cuya forma redondeada y pequeño tamaño (30-60 nm de diámetro) era similar al descrito para los polensomas de olivo (**Figura 60A**). Dado que las 3 especies consideradas secretaban polensomas, los siguientes estudios se centraron en analizar la posible implicación de éstos en fenómenos de reactividad cruzada. Para ello se determinó el reconocimiento por las IgGs de los anticuerpos específicos frente a Ole e 1, Ole e 11 y Ole e 12, con el extracto proteico de los polensomas, tras ser transferidos a membranas de nitrocelulosa (**Figura 60B**). La presencia de proteínas homólogas a Ole e 11 se confirmó en los 3 tipos de polensomas y en el extracto del polen de pino, sin embargo, no se detectó en los extractos de los pólenes de abedul y ballico. Esto podría ser debido al enriquecimiento en Ole e 11 en los polensomas, lo que concordaría con las observaciones realizadas por Pant *et al.* [2012], que expusieron que el potencial de los exosomas como biomarcadores recaía en el enriquecimiento de determinados marcadores con respecto a la fuente de origen. Ole e 11 está implicado en fenómenos de reactividad cruzada entre pólenes, frutas y vegetales [Mahler *et al.*, 2001; Barderas *et al.*, 2007;

Salamanca *et al.*, 2010], clasificándose como estenalérgeno, ya que las PME son ubicuas en el reino vegetal, sin embargo, muestran baja identidad de secuencia [Hauser *et al.*, 2010]. También se confirmó la presencia de proteínas homólogas a Ole e 12 en los 3 tipos de polensomas, así como en el extracto de los pólenes correspondientes. Aunque hasta la fecha se han realizado pocos estudios de reactividad cruzada, estudios previos del laboratorio han permitido observar que Ole e 12 presenta reactividad cruzada entre pólenes, vegetales y frutas [Castro *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2010]. Las PCBER, por su homología con IFR, podrían considerarse también como estenalérgenos [Hauser *et al.*, 2010]. Además, la presencia de bandas IgG reactivas tanto en los polensomas de abedul como de pino, empleando el anticuerpo específico frente a Ole e 12, se explicaría por la presencia de la IFR del polen de abedul (Bet v 6) [Karamloo *et al.*, 1999] y la IFR del polen de pino [Gang *et al.*, 1999].

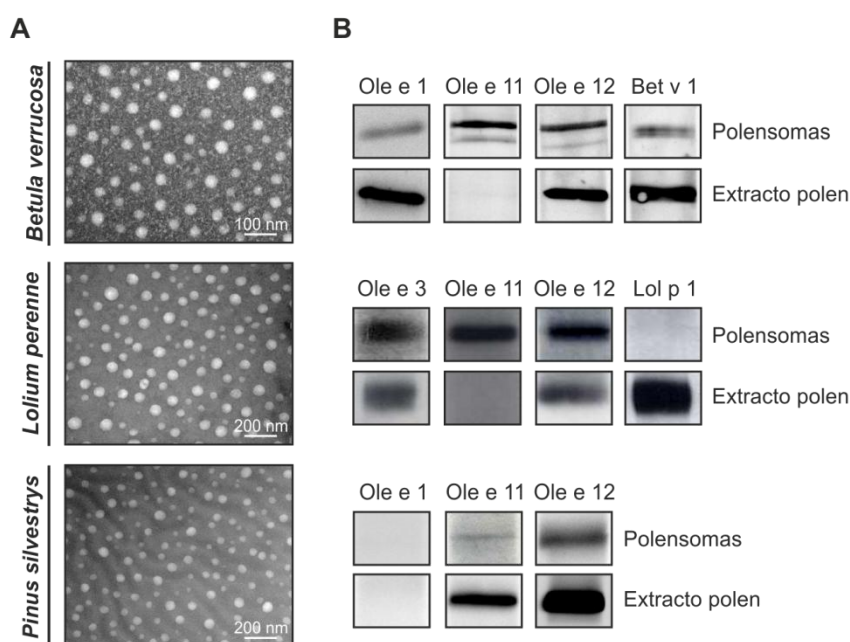


Figura 60. Caracterización de los polensomas secretados por los granos de polen de especies no relacionadas filogenéticamente con el olivo. (A) Micrografías electrónicas de los polensomas de abedul (*Betula verrucosa*), ballico (*Lolium perenne*) y pino (*Pinus sylvestris*). **(B)** Western blot con los anticuerpos policlonales específicos frente a Ole e 1, Ole e 3, Ole e 11, Ole e 12, Bet v 1 y Lol p 1, sobre los polensomas (50 µg). Como control se utilizaron los extractos de los pólenes (30 µg) de cada una de las especies estudiadas.

Sólo se detectó la presencia de la proteína homóloga a Ole e 1 en los polensomas de abedul, así como en el extracto. Esta proteína de abedul, denominada BB18, ha sido descrita recientemente como un miembro no alergénico de la familia Ole e 1-like [Marazuela *et al.*, 2012]. BB18 presenta escasa reactividad cruzada con Ole e 1, limitada principalmente en el extremo C-terminal de la proteína en condiciones no reductoras. No se detectó la presencia de la proteína homóloga a Ole e 1 del polen de ballico -denominada Lol p 11 y descrita como un miembro alergénico de la familia Ole e 1-like [van Ree *et al.*, 1995]-, ni en el extracto, ni en los polensomas. Este resultado podría deberse a problemas de cantidad de la proteína, así como por su escasa identidad de secuencia con Ole e 1 [van Ree *et al.*, 1995]. Los miembros de la familia de proteínas Ole e 1-like también pueden ser clasificadas como estenalérgenos. Además de Lol p 11, otros miembros de esta familia presentan baja identidad de

secuencia y, por tanto, escasa reactividad cruzada con Ole e 1, por ejemplo, Pla I 1, Che a 1 y Phl p 11 [van Ree *et al.*, 1995; Calabozo *et al.*, 2001; Barderas *et al.*, 2002; Marknell DeWitt *et al.*, 2002; Barderas *et al.*, 2004].

Otro de los alérgenos del polen de olivo, detectado en los polensomas de ballico, fue la proteína homóloga a Ole e 3, miembro de la familia de las polcalcinas [Batanero *et al.*, 1996b; Ledesma *et al.*, 1998b]. La presencia de proteínas homólogas a Phl p 7 -polcalcina de la hierba timotea (*Phleum pratense*)- se ha descrito en varias especies de gramíneas estudiadas [Niederberger *et al.*, 1999]. Las polcalcinas son proteínas específicas de polen y se pueden clasificar como euralérgenos, ya que se encuentran implicadas en fenómenos de reactividad cruzada entre pólenes de especies relacionadas o no filogenéticamente [Ledesma *et al.*, 1998b; Wopfner *et al.*, 2007; Hause *et al.*, 2010].

También se analizó la posible presencia de los alérgenos principales del polen de ballico, Lol p 1 y de abedul, Bet v 1. En los polensomas de ballico no se detectó la presencia de Lol p 1 (**Figura 60**), perteneciente a la familia de las β -expansinas, las cuales puede ser clasificadas como estenalérgenos [Roberts *et al.*, 1992]. El hecho de que en los polensomas de ballico no se detectara Lol p 1 podría poner de manifiesto que el alérgeno se libera del grano de polen en otro tipo de material citoplasmático como en gránulos de almidón o en orbículos -gránulos de esporopolenina presentes en las anteras adyacentes a los granos de polen [Taylor *et al.*, 1994]-. Varios estudios han observado que los pólenes de diferentes especies de gramíneas liberan, tras la hidratación en medio hipotónico, gránulos de almidón (<2.5 μ m) portadores de alérgenos, entre ellos Lol p 1 [Spieksma *et al.*, 1995; Schäppi *et al.*, 1997; Grote *et al.*, 2000; Grote *et al.*, 2001]. Además, en el estudio llevado a cabo por De Linares *et al.* [2010], los autores demostraron que la mayor actividad alérgica de Lol p 1 se encontraba en fracciones menores de 3.3 μ m, sugiriendo su posible liberación en gránulos de almidón. Lol p 1 también podría ser liberado en orbículos, como ha sido descrito para otros alérgenos y pólenes [Taylor *et al.*, 1994; Vinckier & Smets, 2001; Jato *et al.*, 2010]. Los estudios llevados a cabo en la presente tesis revelaron la presencia Bet v 1 en los polensomas de abedul. Este alérgeno pertenece a la familia de proteínas relacionadas con patogénesis de plantas (PR-10) [Hauser *et al.*, 2010]. Bet v 1 es un euralérgeno que está implicado en fenómenos de reactividad cruzada entre el polen de árboles del orden *Fagales* (p. ej., abedul, avellano y aliso), frutas de la familia *Rosaceae* (p. ej., manzana, cereza, albaricoque), vegetales de la familia *Apiaceae* (p. ej., apio, zanahoria), especias (p. ej., comino y cilantro), legumbres, frutos secos y semillas [Ebner *et al.*, 1995; Jensen-Jarolim *et al.*, 1997; Hoffmann-Sommergruber *et al.*, 1999; Vieths *et al.*, 2002; Mittag *et al.*, 2004; Ballmen-Weber & Vieths, 2008]. Varios estudios han observado que Bet v 1 puede ser liberado del polen de abedul en partículas citoplasmáticas submicrónicas [Schäppi *et al.*, 1997; Schäppi *et al.*, 1999a; Schäppi *et al.*, 1999b; Grote *et al.*, 2003]. Sin embargo, también se ha descrito que Bet v 1 puede ser liberado en el contexto de partículas inter-orbitales -material citoplasmático con un tamaño comprendido entre los 30-60 nm de diámetro [Taylor *et al.*, 2004]-. El tamaño y la presencia de Bet v 1 en las partículas inter-orbitales concordaría con lo observado para los polensomas de abedul.

Los polensomas están presentes en el aerosol atmosférico

Un último aspecto del posible papel clínico de los polensomas fue estudiar su potencial implicación en la sensibilización y el desarrollo de los procesos alérgicos. Estudios previos realizados por De Linares *et al.*, [2007] revelaron que la mayor actividad alérgica de Ole e 1 es presente en el aerosol

atmosférico, está asociada a las partículas paucimicrónicas ($<1 \mu\text{m}$). Con el fin de analizar la presencia de los polensomas en el aerosol atmosférico se llevaron a cabo estudios empleando un impactador de cascada Andersen para la recogida de las muestras aerobiológicas en la ciudad de Granada. Las muestras del aerosol atmosférico se tomaron en el año 2010, durante 2 periodos: fuera de la época de polinización del olivo (1 y 2 de abril) y durante la época de polinización de este árbol (31 de mayo y 1, 7-9 de junio). Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. De Linares (Universidad Autónoma de Barcelona). En la **Tabla 25** se muestran los recuentos diarios de polen atmosférico registrados durante el periodo de recogida de las muestras. En abril, el único taxón presente en la atmósfera, en cantidades apreciables, fue *Platanus*, con un porcentaje entre el 42-44% del polen total. En mayo y junio, el taxón predominante fue *Olea* (85.5-89% del total) -que coincide con su época de polinización-, seguido por el polen de gramíneas (*Poaceae*) y de árboles del género *Quercus*, con valores que representan entre 6-2.3% y 4.8-0.2%, respectivamente.

Tabla 25. Recuento diario de pólenes en la ciudad de Granada, correspondientes al periodo de muestreo del año 2010.

Día	Total ¹	<i>Quercus</i>	<i>Poaceae</i>	<i>Olea</i>	<i>Parietaria</i>	<i>Pinus</i>	<i>Plantago</i>	<i>Platanus</i>	<i>Chenopodium</i>
1 Abril	178	(0.6%)			(5%)	(2.3%)	(1.7%)	(42%)	
2 Abril	132	(0.8%)	(2.3%)		(12.1%)	(3.8%)	(1.5%)	(44%)	
31 Mayo	2.232	(4.3%)	(4.5%)	(89%)	(0.5%)	(0.3%)	(0.2%)		(0.1%)
1 Junio	1.195	(4.8%)	(4.4%)	(85.5%)	(1.3%)	(0.6%)	(0.6%)	(1.6%)	(0.2%)
7 Junio	679	(2.7%)	(3.7%)	(88.7%)	(0.9%)	(0.4%)			(0.6%)
8 Junio	431	(0.2%)	(5.1%)	(88.6%)	(0.7%)	(0.2%)		(0.2%)	(1.2%)
9 Junio	271	(1.8%)	(6%)	(81.5%)	(1.1%)		(0.4%)		(0.7%)

¹Recuento de polen total expresado en número de granos/mm³ de aire.

Los niveles de polen se indican mediante un código de colores: *blanco*, no polen; *verde*, niveles bajos (árboles, 1-50; y hierbas 1-25); *amarillo*, niveles medios (árboles, 51-100; y hierbas, 26-50); *naranja*, niveles altos (árboles, 101-500; y hierbas, 51-200); y *rojo*, niveles extremos (árboles, >500; y hierbas, >200). Fuente: <http://www.ugr.es/~aerobio/index.html>.

Entre paréntesis se indica el porcentaje de cada polen en relación con el recuento de polen total que se obtuvo cada día. El polen de especies no identificadas da cuenta del 100% del polen total de cada día.

Los filtros aerobiológicos de los diferentes estadios del impactador de cascada Andersen, obtenidos en el muestreo diario, fueron analizados mediante SEM para conocer la naturaleza del material impactado (**Figura 61**). Sólo se observaron granos de polen en los filtros correspondientes al estadio-0 ($>9 \mu\text{m}$). En el estadio-1 ($9-5.8 \mu\text{m}$) se detectaron partículas de tipo orgánico, mientras que en los otros estadios (2-F) se detectó material adherido de diferente naturaleza. Los estudios subsiguientes se centraron en los filtros del estadio-F, que retienen partículas cuyo diámetro aerodinámico es inferior a $0.7 \mu\text{m}$, por ser en estos donde cabría esperar encontrar los polensomas.

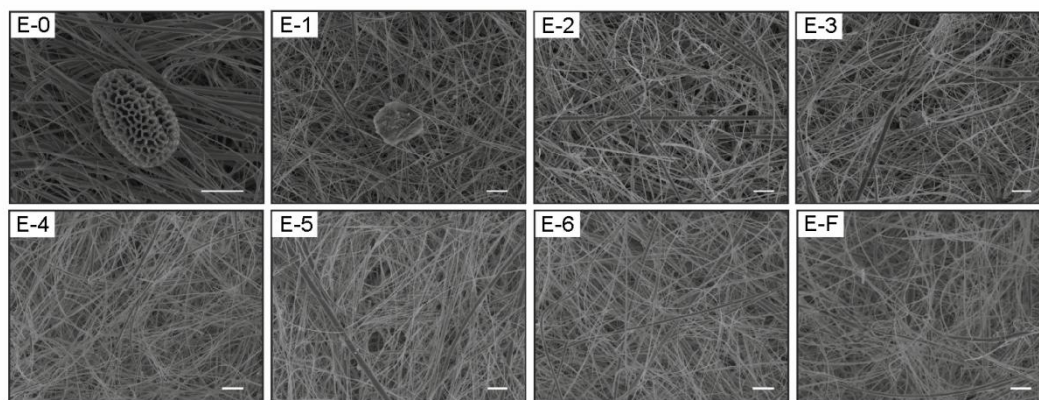


Figura 61. Análisis mediante SEM de los filtros aerobiológicos. Estadío: 0 (E-0, $>9\ \mu\text{m}$), E-1 ($9\text{-}5.8\ \mu\text{m}$), E-2 ($5.8\text{-}4.7\ \mu\text{m}$), E-3 ($4.7\text{-}3.3\ \mu\text{m}$), E-4 ($3.3\text{-}2.1\ \mu\text{m}$), E-5 ($2.1\text{-}1.1\ \mu\text{m}$), E-6 ($1.1\text{-}0.7\ \mu\text{m}$) y E-F ($<0.7\ \mu\text{m}$). Las barras corresponden a $10\ \mu\text{m}$.

Los filtros del estadio-F ($<0.7\ \mu\text{m}$) se lavaron en PBS y las nanovesículas se aislaron a partir del lavado según el protocolo descrito para los polensomas (**Figura 62**). El análisis mediante TEM reveló la presencia de nanovesículas con forma redondeada y un tamaño comprendido entre $27\text{-}55\ \text{nm}$. El tamaño y la forma coincidían con el observado para los polensomas aislados *in vitro* del medio de germinación. No se aislaron este tipo de nanovesículas a partir de filtros control que no habían sido expuestos (**Figura 62B**). Este resultado demuestra la existencia de polensomas en el aerosol atmosférico.

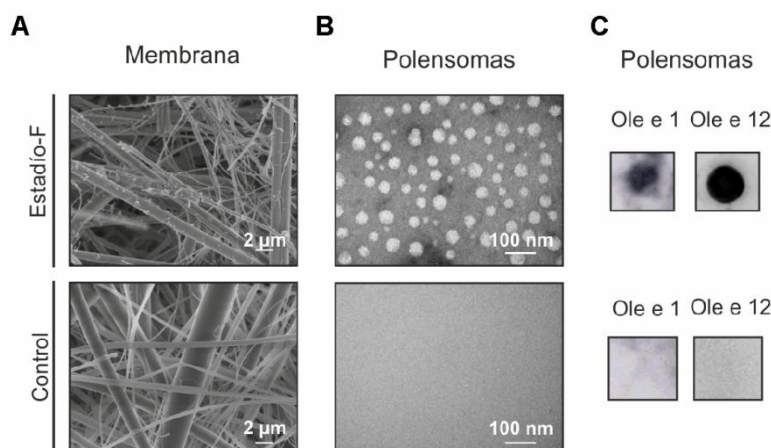


Figura 62. Análisis de los polensomas aislados de los filtros aerobiológicos correspondientes al estadio-F del impactador de cascada Andersen. (A) Micrografías de SEM de los filtros del estadio-F. (B) Micrografías de TEM de los polensomas aislados del lavado de los filtros del estadio-F, tras ser sometido al protocolo de filtración y ultracentrifugación. (C) Dot blot de los polensomas del aerosol atmosférico, empleando anticuerpos específicos frente a Ole e 1 y Ole e 12. Como control se emplearon filtros no expuestos.

Los experimentos de *Dot blot* con anticuerpos específicos frente a Ole e 1 y Ole e 12 demostraron la presencia de estas proteínas -y/o homólogas- en los polensomas aislados del estadio-F recogidos durante el mes de abril (**Figura 62C**). Ambos alérgenos se detectaron en los polensomas presentes en el aerosol atmosférico. En abril, el polen predominante en la atmósfera fue *Platanus*, por lo

que posiblemente los polensomas deriven de este polen. Sin embargo, en la literatura no hay ningún estudio sobre reactividad cruzada entre el polen de olivo y el de *Platanus*. Este resultado sugiere que los polensomas podrían también derivar de pólenes de otras especies aunque no se detecten en la atmósfera en la época de muestreo. Varios estudios han detectado actividad alérgica en muestras del aerosol atmosférico tanto en la estación prepolínica como en la postpolínica de algunos pólenes, como en el caso de Ole e 1 del polen de olivo [De Linares *et al.*, 2007], Pla a 1 del polen de *Platanus* [Fernández-González *et al.*, 2010] o Phl p 5 del polen de *Phleum* [Fahlbusch *et al.*, 2000]. Los polensomas presentes en la atmósfera pueden derivar, bien de la hidratación de los granos de polen, o bien de la germinación de los mismos. En este caso, se ha observado que el polen de abedul se puede depositar sobre las hojas y germinar en condiciones de humedad relativa elevada (*germinación abortiva*), liberando partículas submicrónicas que contienen Bet v 1 [Grote *et al.*, 2003]. En conclusión, los datos presentados en esta tesis demuestran, por primera vez, la presencia de polensomas en el aerosol atmosférico como posible fuente de alérgenos.

Hasta la fecha no se había descrito ningún mecanismo por el cual los alérgenos del grano de polen del olivo se convierten en material *biodisponible* [Rodríguez-García *et al.*, 2003]. Sin embargo, los estudios llevados a cabo por De Linares *et al.* [2007] demostraron que la mayor actividad alérgica de Ole e 1, presente en el aerosol atmosférico, se encontraba asociada a partículas paucimicrónicas. Los datos presentados en esta tesis permiten proponer un nuevo mecanismo de liberación de alérgenos del grano de polen de olivo mediante la **expulsión de partículas citoplasmáticas** denominadas polensomas. Debido a su pequeño tamaño, podrían ser inhalados y depositados en las vías aéreas inferiores, las cuales no pueden ser alcanzadas por los granos de polen intactos [Behrend & Becker, 2001; Taylor *et al.*, 2007b]. Este nuevo mecanismo de liberación de alérgenos no sólo se restringe al olivo, sino que los resultados apuntan hacia los polensomas como un mecanismo de liberación común para una variedad de pólenes como el abedul, ballico y pino. Además, su relevancia clínica como fuente de alérgenos está avalada por los datos obtenidos con pacientes alérgicos, como indican los datos de unión a IgE, activación de basófilos humanos y pruebas cutáneas positivas. De esta forma, los polensomas podrían desencadenar una reacción alérgica en individuos susceptibles. Además de alérgenos, los polensomas posiblemente contengan otras moléculas, presentes en el grano de polen, que pueden contribuir a la alergenidad de las nanovesículas. Entre estas moléculas con propiedades adyuvantes podemos citar: (I) NADP(H) oxidasas que generan especies reactivas de oxígeno que actúan incrementando la inflamación alérgica [Dharajiya *et al.*, 2007]; (II) mediadores lipídicos bioactivos (PALMS) que presentan propiedades químicas y funcionales similares a los leucotrienos y prostaglandinas, lo que contribuye a la generación de un microentorno que favorece una respuesta Th2 [Gilles *et al.*, 2009]; y (III) adenosina, que ha sido identificada recientemente como un potente inmunoregulador de la alergia al polen actuando a nivel de DCs [Gilles *et al.*, 2011]. Estudios preliminares realizados en nuestro grupo han detectado actividad NADP(H) oxidasas en los polensomas de olivo [Mas *et al.*, datos no publicados]. La presencia de estas enzimas y otros compuestos inmunoestimuladores en los polensomas, junto a los alérgenos, favorecería la sensibilización y la aparición de la sintomatología clínica. Además, el hecho de que los polensomas se encuentren presentes en la atmósfera los hace susceptibles de reaccionar con partículas de polución, las cuales

presentan propiedades adyuvantes para promover una reacción alérgica [Behrendt & Becker, 2001; Taylor *et al.*, 2007b].

Aunque se requieren futuros estudios, los polensomas podrían jugar un papel importante en la respuesta alérgica. Esto abre una puerta y, posiblemente, nuevas perspectivas para el entendimiento de los eventos que tienen lugar en las primeras etapas de la sensibilización y exacerbación de las enfermedades antes de los mecanismos inducidos por los alérgenos. Además, los polensomas proporcionan una perspectiva a la dinámica de secreción de proteínas durante los procesos de germinación y crecimiento del tubo polínico, los cuales son críticos para el éxito del proceso de fertilización en las plantas con flor.

CONCLUSIONES

BLOQUE I. EXOSOMAS TOLEROGÉNICOS DERIVADOS DEL BALF COMO POSIBLE VACUNA NASAL PARA LA ALERGIA

- I. Se ha establecido un modelo de ratón tolerante a Ole e 1. Este modelo se ha utilizado como fuente de exosomas tolerogénicos (Exo_{Tol}) derivados del BALF.
- II. Se han aislado y caracterizado físico-químicamente los Exo_{Tol} en comparación con los derivados de ratones *naïve* (Exo_{Con}).
- III. Se ha ensayado, en un modelo de ratón alérgico, un protocolo de tratamiento profiláctico basado en la administración i.n. de Exo_{Tol}. Los exosomas han demostrado ser eficaces en prevenir la síntesis de IgE y la respuesta inflamatoria en pulmón ocasionadas por la sensibilización al alérgeno principal del polen de olivo Ole e 1, así como a Bet v 1 del polen de abedul, alérgeno no relacionado filogenéticamente.
- IV. Se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre los Exo_{Con} y Exo_{Tol} mediante técnicas ómicas: proteómica y transcriptómica. Este estudio ha permitido proponer varias moléculas candidatas que participarían en las propiedades inmunosupresoras de los Exo_{Tol}:
 - a. Las proteínas del surfactante pulmonar SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, la histona H4, la coronina 1A y las actinas citoplasmáticas 1 (ACTB) y 2 (ACTG1).
 - b. Los genes diferencialmente expresados *Actr1a*, *Spred2* y *Arhgef12*, implicados en la regulación del citoesqueleto de actina y en la transducción de señales.
 - c. Los miRNAs: miR-15a, miR-103/107 y miR-99b.
- V. Se han aislado y caracterizado físico-químicamente los exosomas alérgicos (Exo_{Alé}) derivados del BALF de ratones sensibilizados a Ole e 1. El tratamiento con Exo_{Alé} antes de la sensibilización a Ole e 1 incrementa la respuesta de las células Th específicas, así como los niveles de expresión de los marcadores de inflamación ADAM-8 y CCL11. Estos resultados sugieren un posible papel de los Exo_{Alé} en la alergia. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales ensayadas, los Exo_{Alé} no han sido capaces *per se* de inducir una respuesta alérgica a Ole e 1 en ratón.

BLOQUE II: NANOVESÍCULAS DE SECRECIÓN DEL POLEN COMO VEHÍCULOS DE ALÉRGENOS

- I. Se han aislado y caracterizado físico-químicamente nanovesículas liberadas durante la germinación *in vitro* del polen de olivo, a las que se ha denominado “polensomas”.
- II. Los estudios de cinética de liberación de los polensomas han demostrado que son secretados durante la hidratación y la germinación del polen *in vitro*.
- III. Se ha demostrado la presencia de alérgenos en los polensomas, lo que ha permitido proponerlos como un nuevo vehículo de aeroalérgenos del polen de olivo (*Olea europaea*) y de otras especies no relacionadas filogenéticamente con el olivo y de relevancia clínica en alergología, como abedul (*Betula verrucosa*), ballico (*Lolium perenne*) y pino (*Pinus sylvestris*). Además, los polensomas presentan actividad alérgica, tanto *in vitro* como *in vivo*, puesto que son capaces de unir IgEs, activar basófilos y provocar una prueba cutánea positiva en pacientes alérgicos al polen de olivo. La relevancia clínica de los polensomas en alergia se ve apoyada por los estudios aerobiológicos que demuestran la presencia de estas vesículas en el aerosol atmosférico. De esta forma y debido a su tamaño, los polensomas facilitarían el acceso de los alérgenos a las vías respiratorias inferiores donde desencadenarían una reacción alérgica en individuos susceptibles.
- IV. Los estudios ultraestructurales han demostrado que Ole e 12 se localiza en vesículas de tamaño heterogéneo (200-600 de diámetro) que se distribuyen próximas a la membrana plasmática y, en particular, en la región subapical del tubo polínico. Estos datos sugieren la participación de dichas estructuras en el tráfico vesicular. Además, nuestros datos indican que los polensomas comprenden una población heterogénea de vesículas de secreción -en su composición y origen subcelular-, cuya acción coordinada permitiría el crecimiento del tubo polínico. Sin embargo, a partir de estos estudios no se puede concluir que una subpoblación de polensomas sean exosomas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abusamra, A.J., Z. Zhong, X. Zheng, M. Li, T.E. Ichim, J.L. Chin, & W.P. Min. 2005. *Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis*. *Blood Cells Mol Dis* **35**:169-173.
- Adkins, H.B., J. Brojatsch, & J.A. Young. 2000. *Identification and characterization of a shared TNFR-related receptor for subgroup B, D, and E avian leukosis viruses reveal cysteine residues required specifically for subgroup E viral entry*. *J Virol* **74**:3572-3578.
- Admyre, C., J. Grunewald, J. Thyberg, S. Gripenback, G. Tornling, A. Eklund, A. Scheynius, & S. Gabrielsson. 2003. *Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid*. *Eur Respir J* **22**:578-583.
- Admyre, C., S.M. Johansson, S. Paulie, & S. Gabrielsson. 2006. *Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT*. *Eur J Immunol* **36**:1772-1781.
- Admyre, C., B. Bohle, S.M. Johansson, M. Focke-Tejkl, R. Valenta, A. Scheynius, & S. Gabrielsson. 2007a. *B cell-derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce TH2-like cytokines*. *J Allergy Clin Immunol* **120**:1418-1424.
- Admyre, C., S.M. Johansson, K.R. Qazi, J.J. Filen, R. Lahesmaa, M. Norman, E.P. Neve, A. Scheynius, & S. Gabrielsson. 2007b. *Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk*. *J Immunol* **179**:1969-1978.
- Admyre, C., E. Telemo, N. Almqvist, J. Lotvall, R. Lahesmaa, A. Scheynius, & S. Gabrielsson. 2008. *Exosomes - nanovesicles with possible roles in allergic inflammation*. *Allergy* **63**:404-408.
- Akbari, O., R.H. DeKruyff, & D.T. Umetsu. 2001. *Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen*. *Nat Immunol* **2**:725-731.
- Akbari, O., G.J. Freeman, E.H. Meyer, E.A. Greenfield, T.T. Chang, A.H. Sharpe, G. Berry, R.H. DeKruyff, & D.T. Umetsu. 2002. *Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity*. *Nat Med* **8**:1024-1032.
- Akdis, C.A., M. Akdis, T. Blesken, D. Wymann, S.S. Alkan, U. Müller, & K. Blaser. 1996. *Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro*. *J Clin Invest* **98**:1676-1683.
- Akdis, C.A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wuthrich, & K. Blaser. 1998. *Role of interleukin 10 in specific immunotherapy*. *J Clin Invest* **102**:98-106.
- Akdis, C.A., K. Blaser, & M. Akdis. 2004a. *Apoptosis in tissue inflammation and allergic disease*. *Curr Opin Immunol* **16**:717-723.
- Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C.B. Schmidt-Weber, K. Blaser, & C.A. Akdis. 2004b. *Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells*. *J Exp Med* **199**:1567-1575.
- Akdis, C.A. 2006. *Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease*. *Curr Opin Immunol* **18**:718-726.
- Akdis, M., & C.A. Akdis. 2007. *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol* **119**:780-791.
- Akdis, C.A., & M. Akdis. 2011. *Mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol* **127**:18-27; quiz 28-19.
- Akdis, M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gómez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Ouaked, A. Schaffartzik, W. Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, & C.A. Akdis. 2011.

- Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases.* J Allergy Clin Immunol **127**:701-721 e701-770.
- Akiyama, M., K. Sakai, C. Takayama, T. Yanagi, Y. Yamanaka, J.R. McMillan, & H. Shimizu. 2008. *CGI-58 is an alpha/beta-hydrolase within lipid transporting lamellar granules of differentiated keratinocytes.* Am J Pathol **173**:1349-1360.
- Akkoc, T., P.J. de Koning, B. Ruckert, I. Barlan, M. Akdis, & C.A. Akdis. 2008. *Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases.* J Allergy Clin Immunol **121**:652-658 e651.
- Akkoc, T., M. Akdis, & C.A. Akdis. 2011. *Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy.* Allergy Asthma Immunol Res **3**:11-20.
- Al-Nedawi, K., B. Meehan, R.S. Kerbel, A.C. Allison, & J. Rak. 2009. *Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR.* Proc Natl Acad Sci U S A **106**:3794-3799.
- Alajez, N.M., M. Lenarduzzi, E. Ito, A.B. Hui, W. Shi, J. Bruce, S. Yue, S.H. Huang, W. Xu, J. Waldron, B. O'Sullivan, & F.F. Liu. 2011. *MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway.* Cancer Res **71**:2381-2391.
- Alché, J.D., A.J. Castro, A. Olmedilla, M.C. Fernández, R. Rodríguez, M. Villalba, & M.I. Rodríguez-García. 1999. *The major olive pollen allergen (Ole e 1) shows both gametophytic and sporophytic expression during anther development, and its synthesis and storage takes place in the RER.* J Cell Sci **112** (Pt 15):2501-2509.
- Alché, J.D., A.J. Castro, & M.I. Rodríguez-García. 2002. *Localization of transcripts corresponding to the major allergen from olive pollen (Ole e 1) by electron microscopic non-radioactive in situ RT-PCR.* Micron **33**:33-37.
- Alché, J.D., M. M'Rani-Alaoui, A.J. Castro, & M.I. Rodríguez-García. 2004. *Ole e 1, the major allergen from olive (Olea europaea L.) pollen, increases its expression and is released to the culture medium during in vitro germination.* Plant Cell Physiol **45**:1149-1157.
- Alegre-Cebollada, J., M. Cunietti, E. Herrero-Galan, J.G. Gavilanes, & A. Martínez-del-Pozo. 2008. *Calorimetric scrutiny of lipid binding by sticholysin II toxin mutants.* J Mol Biol **382**:920-930.
- Alexander, C., M. Tarzi, M. Larche, & A.B. Kay. 2005. *The effect of Fel d 1-derived T-cell peptides on upper and lower airway outcome measurements in cat-allergic subjects.* Allergy **60**:1269-1274.
- Alexiou, P., M. Maragkakis, G.L. Papadopoulos, M. Reczko, & A.G. Hatzigeorgiou. 2009. *Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification.* Bioinformatics **25**:3049-3055.
- Aline, F., D. Bout, S. Amigorena, P. Roingeard, & I. Dimier-Poisson. 2004. *Toxoplasma gondii antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against T. gondii infection.* Infect Immun **72**:4127-4137.
- Almqvist, N., A. Lonnqvist, S. Hultkrantz, C. Rask, & E. Telemo. 2008. *Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma.* Immunology **125**:21-27.
- Alonso, R., M.C. Rodríguez, J. Pindado, E. Merino, I. Merida, & M. Izquierdo. 2005. *Diacylglycerol kinase alpha regulates the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes.* J Biol Chem **280**:28439-28450.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, & D.J. Lipman. 1997. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.* Nucleic Acids Res **25**:3389-3402.

- Álvarez-Ordoñez, A., D.J. Mouwen, M. Lopez, & M. Prieto. 2011. *Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria*. J Microbiol Methods **84**:369-378.
- Ambros, V., & R.C. Lee. 2004. *Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning*. Methods Mol Biol **265**:131-158.
- Ameyar, M., M. Wisniewska, & J.B. Weitzman. 2003. *A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against*. Biochimie **85**:747-752.
- Amuguni, J.H., S. Lee, K.O. Kerstein, D.W. Brown, B.R. Belitsky, J.E. Herrmann, G.T. Keusch, A.L. Sonenshein, & S. Tzipori. 2011. *Sublingually administered Bacillus subtilis cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice*. Vaccine **29**:4778-4784.
- An, Q., R. Huckelhoven, K.H. Kogel, & A.J. van Bel. 2006. *Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus*. Cell Microbiol **8**:1009-1019.
- An, Q., A.J. van Bel, & R. Huckelhoven. 2007. *Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies?* Plant Signal Behav **2**:4-7.
- Andersson, K., & J. Lidholm. 2003. *Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens*. Int Arch Allergy Immunol **130**:87-107.
- André, F., N.E. Schartz, M. Movassagh, C. Flament, P. Pautier, P. Morice, C. Pomel, C. Lhomme, B. Escudier, T. Le Chevalier, T. Tursz, S. Amigorena, G. Raposo, E. Angevin, & L. Zitvogel. 2002. *Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes*. Lancet **360**:295-305.
- Andreola, G., L. Rivoltini, C. Castelli, V. Huber, P. Perego, P. Deho, P. Squarcina, P. Accornero, F. Lozupone, L. Lugini, A. Stringaro, A. Molinari, G. Arancia, M. Gentile, G. Parmiani, & S. Fais. 2002. *Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles*. J Exp Med **195**:1303-1316.
- Andrews, N.W., & S. Chakrabarti. 2005. *There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII*. Trends Cell Biol **15**:626-631.
- Apostolopoulou, M., & L. Ligon. 2012. *Cadherin-23 mediates heterotypic cell-cell adhesion between breast cancer epithelial cells and fibroblasts*. PLoS One **7**:e33289.
- Araki, K., A.P. Turner, V.O. Shaffer, S. Gangappa, S.A. Keller, M.F. Bachmann, C.P. Larsen, & R. Ahmed. 2009. *mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation*. Nature **460**:108-112.
- Arimura, N., C. Menager, Y. Fukata, & K. Kaibuchi. 2004. *Role of CRMP-2 in neuronal polarity*. J Neurobiol **58**:34-47.
- Asea, A., C. Jean-Pierre, P. Kaur, P. Rao, I.M. Linhares, D. Skupski, & S.S. Witkin. 2008. *Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids*. J Reprod Immunol **79**:12-17.
- Asero, R., R. Monsalve, & D. Barber. 2008. *Profilin sensitization detected in the office by skin prick test: a study of prevalence and clinical relevance of profilin as a plant food allergen*. Clin Exp Allergy **38**:1033-1037.
- Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, & G. Sherlock. 2000. *Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium*. Nat Genet **25**:25-29.
- Astori, M., C. von Garnier, A. Kettner, N. Dufour, G. Corradin, & F. Spertini. 2000. *Inducing tolerance by intranasal administration of long peptides in naive and primed CBA/J mice*. J Immunol **165**:3497-3505.
- Axelsson, U., & C.B. Laurell. 1965. *Hereditary variants of serum alpha-1-antitrypsin*. Am J Hum Genet **17**:466-472.

- Bacsi, A., B.K. Choudhury, N. Dharajiya, S. Sur, & I. Boldogh. 2006. *Subpollen particles: carriers of allergenic proteins and oxidases*. J Allergy Clin Immunol **118**:844-850.
- Baik, J.Y., E.J. Joo, Y.H. Kim, & G.M. Lee. 2008. *Limitations to the comparative proteomic analysis of thrombopoietin producing Chinese hamster ovary cells treated with sodium butyrate*. J Biotechnol **133**:461-468.
- Baker, M.J., E. Gazi, M.D. Brown, J.H. Shanks, N.W. Clarke, & P. Gardner. 2009. *Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer*. J Biophotonics **2**:104-113.
- Baldo, B.A., R.C. Panzani, D. Bass, & R. Zerboni. 1992. *Olive (Olea europea) and privet (Ligustrum vulgare) pollen allergens. Identification and cross-reactivity with grass pollen proteins*. Mol Immunol **29**:1209-1218.
- Baluska, F., A. Hlavacka, J. Samaj, K. Palme, D.G. Robinson, T. Matoh, D.W. McCurdy, D. Menzel, & D. Volkmann. 2002. *F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartments*. Plant Physiol **130**:422-431.
- Baluska, F., F. Liners, A. Hlavacka, M. Schlicht, P. Van Cutsem, D.W. McCurdy, & D. Menzel. 2005. *Cell wall pectins and xyloglucans are internalized into dividing root cells and accumulate within cell plates during cytokinesis*. Protoplasma **225**:141-155.
- Ballmer-Weber, B.K., J.M. Weber, S. Vieths, & B. Wuthrich. 2008. *Predictive value of the sulfidoleukotriene release assay in oral allergy syndrome to celery, hazelnut, & carrot*. J Investig Allergol Clin Immunol **18**:93-99.
- Baranyi, U., B. Linhart, N. Pilat, M. Gattringer, J. Bagley, F. Muehlbacher, J. Iacomini, R. Valenta, & T. Wekerle. 2008. *Tolerization of a type I allergic immune response through transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells*. J Immunol **180**:8168-8175.
- Barber, D., J. Carpizo, M.C. García-Rumbao, F. Polo, & F. Juan. 1990. *Allergenic variability in olea pollen*. Ann Allergy **64**:43-46.
- Barber, D., C. Moreno, A. Ledesma, P. Serrano, A. Galan, M. Villalba, F. Guerra, M. Lombardero, & R. Rodríguez. 2007. *Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications*. J Investig Allergol Clin Immunol **17 Suppl 1**:11-16.
- Barderas, R., M. Villalba, M. Lombardero, & R. Rodríguez. 2002. *Identification and characterization of Che a 1 allergen from Chenopodium album pollen*. Int Arch Allergy Immunol **127**:47-54.
- Barderas, R., M. Villalba, & R. Rodríguez. 2004. *Che a 1: recombinant expression, purification and correspondence to the natural form*. Int Arch Allergy Immunol **135**:284-292.
- Barderas, R., A. Purohit, I. Papanikolaou, R. Rodríguez, G. Pauli, & M. Villalba. 2005. *Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1*. J Allergy Clin Immunol **115**:351-357.
- Barderas, R., A. Purohit, R. Rodríguez, G. Pauli, & M. Villalba. 2006. *Isolation of the main allergen Fra e 1 from ash (Fraxinus excelsior) pollen: comparison of the natural and recombinant forms*. Ann Allergy Asthma Immunol **96**:557-563.
- Barderas, R., J. García-Selles, G. Salamanca, C. Colas, D. Barber, R. Rodríguez, & M. Villalba. 2007. *A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (Salsola kali) pollen*. Clin Exp Allergy **37**:1111-1119.
- Baroukh, N.N., & E. Van Obberghen. 2009. *Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain*. FEBS J **276**:6509-6521.
- Barral, P., C. Suarez, E. Batanero, C. Alfonso, J.D. Alché, M.I. Rodríguez-García, M. Villalba, G. Rivas, & R. Rodríguez. 2005. *An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination*. Biochem J **390**:77-84.

- Batanero, E., M. Villalba, C. Lopez-Otín, & R. Rodríguez. 1994a. *Isolation and characterization of an olive allergen-like protein from lilac pollen. Sequence analysis of three cDNA encoding protein isoforms*. Eur J Biochem **221**:187-193.
- Batanero, E., M. Villalba, & R. Rodríguez. 1994b. *Glycosylation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety*. Mol Immunol **31**:31-37.
- Batanero, E., M.A. González De La Pena, M. Villalba, R.I. Monsalve, M. Martín-Esteban, & R. Rodríguez. 1996a. *Isolation, cDNA cloning and expression of Lig v 1, the major allergen from privet pollen*. Clin Exp Allergy **26**:1401-1410.
- Batanero, E., M. Villalba, A. Ledesma, X.S. Puente, & R. Rodríguez. 1996b. *Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins*. Eur J Biochem **241**:772-778.
- Batanero, E., M. Villalba, R.I. Monsalve, & R. Rodríguez. 1996c. *Cross-reactivity between the major allergen from olive pollen and unrelated glycoproteins: evidence of an epitope in the glycan moiety of the allergen*. J Allergy Clin Immunol **97**:1264-1271.
- Batanero, E., A. Ledesma, M. Villalba, & R. Rodríguez. 1997. *Purification, amino acid sequence and immunological characterization of Ole e 6, a cysteine-enriched allergen from olive tree pollen*. FEBS Lett **410**:293-296.
- Batanero, E., J.F. Crespo, R.I. Monsalve, M. Martín-Esteban, M. Villalba, & R. Rodríguez. 1999. *IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1*. J Allergy Clin Immunol **103**:147-153.
- Batanero, E., P. Barral, M. Villalba, & R. Rodríguez. 2002. *Sensitization of mice with olive pollen allergen Ole e 1 induces a Th2 response*. Int Arch Allergy Immunol **127**:269-275.
- Batanero, E., R. Rodríguez, & M. Villalba. 2010. *Olive pollen allergens: an insight into clinical, diagnostic and therapeutic concepts of allergy*. Oxford. Ed Elsevier 1021-1031.
- Batista, B.S., W.S. Eng, K.T. Pilobello, K.D. Hendricks-Munoz, & L.K. Mahal. 2011. *Identification of a conserved glycan signature for microvesicles*. J Proteome Res **10**:4624-4633.
- Battaglia, M., B.R. Blazar, & M.G. Roncarolo. 2002. *The puzzling world of murine T regulatory cells*. Microbes Infect **4**:559-566.
- Baugh, A.T., L.D. Favrot, O.C. Thomas, C.D. Dukes, & J.P. McGovern. 1965. *Studies on hypersensitivity to Hymenoptera. I. Antigenicity and cross reactivity of body extracts*. Ann Allergy **23**:430-433.
- Bazzoni, F., & B. Beutler. 1996. *The tumor necrosis factor ligand and receptor families*. N Engl J Med **334**:1717-1725.
- Beauvillain, C., S. Ruiz, R. Guiton, D. Bout, & I. Dimier-Poisson. 2007. *A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against T. gondii infection in syngeneic and allogeneic mice*. Microbes Infect **9**:1614-1622.
- Behrendt, H., & W.M. Becker. 2001. *Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors*. Curr Opin Immunol **13**:709-715.
- Bellingham, S.A., B.M. Coleman, & A.F. Hill. 2012. *Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells*. Nucleic Acids Res **40**:10937-10949.
- Berger, T., A. Togawa, G.S. Duncan, A.J. Elia, A. You-Ten, A. Wakeham, H.E. Fong, C.C. Cheung, & T.W. Mak. 2006. *Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury*. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:1834-1839.

- Bhatnagar, S., K. Shinagawa, F.J. Castellino, & J.S. Schorey. 2007. *Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo*. *Blood* **110**:3234-3244.
- Blackley, C.H. 1873. *Experimental researches on the causes and natura of catarrhus aestivus*. London. Ed. Bailieri Tindall & Findak Cox.
- Blanchard, N., D. Lankar, F. Fauré, A. Regnault, C. Dumont, G. Raposo, & C. Hivroz. 2002. *TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex*. *J Immunol* **168**:3235-3241.
- Blume, C., S. Foerster, S. Gilles, W.M. Becker, J. Ring, H. Behrendt, A. Petersen, & C. Traidl-Hoffmann. 2009. *Human epithelial cells of the respiratory tract and the skin differentially internalize grass pollen allergens*. *J Invest Dermatol* **129**:1935-1944.
- Boehm, T., & F. Zufall. 2006. *MHC peptides and the sensory evaluation of genotype*. *Trends Neurosci* **29**:100-107.
- Boluda, L., C. Alonso, & E. Fernández-Caldas. 1998. *Purification, characterization, and partial sequencing of two new allergens of Olea europaea*. *J Allergy Clin Immunol* **101**:210-216.
- Boluda, L., J. Sastre, M. Casanovas, & E. Fernández-Caldas. 1999. *Determination of Ole e 1 by enzyme immunoassay and scanning densitometry. Validation by skin-prick testing*. *J Immunol Methods* **223**:17-26.
- Bosch, M., A.Y. Cheung, & P.K. Hepler. 2005. *Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth*. *Plant Physiol* **138**:1334-1346.
- Bosch, A., Miñán, A., Vescina, C., Degrossi, J., Gatti, B., Montanaro, P., Messina, M., Franco, M., Vay, C., Schmitt, J., D. Naumann, & O. Yantorno. 2008. *Fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from sputum samples from cystic fibrosis patients*. *J Clin Microbiol* **46**: 2535-2546.
- Bosschaerts, T., M. Guillems, W. Noel, M. Herin, R.F. Burk, K.E. Hill, L. Brys, G. Raes, G.H. Ghassabeh, P. De Baetselier, & A. Beschin. 2008. *Alternatively activated myeloid cells limit pathogenicity associated with African trypanosomiasis through the IL-10 inducible gene selenoprotein P*. *J Immunol* **180**:6168-6175.
- Bostock, J. 1828. *Of the Catarrhus AEstivus, or Summer Catarrh*. *Med Chir Trans* **14**:437-446.
- Bou Daher, F., Y. Chebli, & A. Geitmann. 2009. *Optimization of conditions for germination of cold-stored Arabidopsis thaliana pollen*. *Plant Cell Rep* **28**:347-357.
- Bousquet, J., R. Lockey, & H.J. Malling. 1998. *Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper*. *J Allergy Clin Immunol* **102**:558-562.
- Bousquet, J. 2006. *Sublingual immunotherapy: validated!* *Allergy Suppl* **81 Allergy** **57 Suppl** **81** vol 61.
- Bozza, P.T., H.C. Castro-Faria-Neto, C. Penido, A.P. Laranjeira, P.M. Silva, M.A. Martins, & R.S. Cordeiro. 1994. *IL-5 accounts for the mouse pleural eosinophil accumulation triggered by antigen but not by LPS*. *Immunopharmacology* **27**:131-136.
- Bradshaw, A.D. 2012. *Diverse biological functions of the SPARC family of proteins*. *Int J Biochem Cell Biol* **44**:480-488.
- Brandalise, M., F.E. Severino, M.P. Maluf, & I.G. Maia. 2009. *The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (Coffea arabica) drives a stress-responsive expression in leaves*. *Plant Cell Rep* **28**:1699-1708.
- Breigina, M.A., N.P. Matveeva, D.S. Andreiuk, & I.P. Ermakov. 2012. *[Transmembrane transport of K⁺ and Cl⁻ during pollen grain activation in vivo and in vitro]*. *Ontogenez* **43**:103-112.

- Brennan, P.A., & F. Zufall. 2006. *Pheromonal communication in vertebrates*. Nature **444**:308-315.
- Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, & A. Zychlinsky. 2004. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science **303**:1532-1535.
- Brown, S.J., K. Kroboth, A. Sandilands, L.E. Campbell, E. Pohler, S. Kezic, H.J. Cordell, W.H. McLean, & A.D. Irvine. 2012. *Intragenic copy number variation within filaggrin contributes to the risk of atopic dermatitis with a dose-dependent effect*. J Invest Dermatol **132**:98-104.
- Bruce, M.G., & A. Ferguson. 1986. *Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen*. Immunology **57**:627-630.
- Bruce, M.G., & A. Ferguson. 1987. *Oral tolerance induced by gut-processed antigen*. Adv Exp Med Biol **216A**:721-731.
- Buck, L., & R. Axel. 1991. *A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition*. Cell **65**:175-187.
- Bufe, A., G. Schramm, M.B. Keown, M. Schlaak, & W.M. Becker. 1995. *Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase*. FEBS Lett **363**:6-12.
- Bulek, K., S. Swaidani, M. Aronica, & X. Li. 2010. *Epithelium: the interplay between innate and Th2 immunity*. Immunol Cell Biol **88**:257-268.
- Burgel, P.R., & J.A. Nadel. 2008. *Epidermal growth factor receptor-mediated innate immune responses and their roles in airway diseases*. Eur Respir J **32**:1068-1081.
- Burgler, S., N. Ouaked, C. Bassin, T.M. Basinski, P.Y. Mantel, K. Siegmund, N. Meyer, C.A. Akdis, & C.B. Schmidt-Weber. 2009. *Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells*. J Allergy Clin Immunol **123**:588-595, 595 e581-587.
- Burks, A.W., S. Laubach, & S.M. Jones. 2008. *Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment*. J Allergy Clin Immunol **121**:1344-1350.
- Buschow, S.I., B.W. van Balkom, M. Aalberts, A.J. Heck, M. Wauben, & W. Stoorvogel. 2010. *MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis*. Immunol Cell Biol **88**:851-856.
- Caby, M.P., D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, G. Raposo, & C. Bonnerot. 2005. *Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma*. Int Immunol **17**:879-887.
- Calabozo, B., D. Barber, & F. Polo. 2001. *Purification and characterization of the main allergen of Plantago lanceolata pollen, Pla l 1*. Clin Exp Allergy **31**:322-330.
- Calin, G.A., C. Sevignani, C.D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini, & C.M. Croce. 2004. *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A **101**:2999-3004.
- Campos, E.I., & D. Reinberg. 2009. *Histones: annotating chromatin*. Annu Rev Genet **43**:559-599.
- Carayon, K., K. Chaoui, E. Ronzier, I. Lazar, J. Bertrand-Michel, V. Roques, S. Balor, F. Terce, A. Lopez, L. Salome, & E. Joly. 2011. *Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation*. J Biol Chem **286**:34426-34439.
- Cárdaba, B., C. Vilches, E. Martin, B. de Andrés, V. del Pozo, D. Hernandez, S. Gallardo, J.C. Fernández, M. Villalba, R. Rodríguez, & et al. 1993. *DR7 and DQ2 are positively associated with immunoglobulin-E response to the main antigen of olive pollen (Ole e I) in allergic patients*. Hum Immunol **38**:293-299.

- Cárdaba, B., V. Del Pozo, A. Jurado, S. Gallardo, I. Cortegano, I. Arrieta, A. Del Amo, P. Tramon, F. Florido, J. Sastre, P. Palomino, & C. Lahoz. 1998. *Olive pollen allergy: searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule*. Clin Exp Allergy **28**:413-422.
- Cárdaba, B., I. Cortegano, F. Florido, I. Arrieta, E. Aceituno, V. del Pozo, S. Gallardo, M. Rojo, P. Palomino, & C. Lahoz. 2000. *Genetic restrictions in olive pollen allergy*. J Allergy Clin Immunol **105**:292-298.
- Cárdaba, B., I. Cortegano, F. Florido, E. Civantos, V. del Pozo, S. Gallardo, M. Rojo, P. Palomino, & C. Lahoz. 2002. *Update in the understanding of genetic predisposition to olive pollen sensitization*. Allergy **57 Suppl 71**:41-46.
- Cárdaba, B., E. Llanes, M. Chacartegui, B. Sastre, E. Lopez, R. Molla, V. del Pozo, F. Florido, J. Quiralte, P. Palomino, & C. Lahoz. 2007. *Modulation of allergic response by gene-environment interaction: olive pollen allergy*. J Investig Allergol Clin Immunol **17 Suppl 1**:31-35.
- Casado-Vela, J., S. Selles, & R.B. Martínez. 2006. *Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (Lycopersicon esculentum M.) fruits and detection of viral coat protein*. Proteomics **6 Suppl 1**:S196-206.
- Casado-Vela, J., E. Rodríguez-Suarez, I. Iloro, A. Ametzazurra, N. Alkorta, J.A. García-Velasco, R. Matorras, B. Prieto, S. González, D. Nagore, L. Simon, & F. Elortza. 2009. *Comprehensive proteomic analysis of human endometrial fluid aspirate*. J Proteome Res **8**:4622-4632.
- Castro, L., Palomares, O., Fernández-Crespo J., Villalba M., J. Rodríguez, & R. Rodríguez. 2006. *Alérgenos asociados a la sensibilización melocotón-olivo en pacientes de Madrid*. Presented at XXV Congr., SEAIC, Valencia, October 25-28.
- Castro, L., Sirvent, S., Prado, N., Batanero, E., Torres, M., Mas, S., Metz-Favré, C., Pauli, G., R. Rodríguez, & M. Villalba. 2010. *An isoflavone reductase is a new allergen from ash pollen*. Presented at 28th Congr., EAACI, London, June 5-9.
- Chao, A., C.Y. Lin, Y.S. Lee, C.L. Tsai, P.C. Wei, S. Hsueh, T.I. Wu, C.N. Tsai, C.J. Wang, A.S. Chao, T.H. Wang, & C.H. Lai. 2012. *Regulation of ovarian cancer progression by microRNA-187 through targeting Disabled homolog-2*. Oncogene **31**:764-775.
- Chaput, N., C. Flament, S. Viaud, J. Taieb, S. Roux, A. Spatz, F. André, J.B. LePecq, M. Boussac, J. Garin, S. Amigorena, C. Théry, & L. Zitvogel. 2006. *Dendritic cell derived-exosomes: biology and clinical implementations*. J Leukoc Biol **80**:471-478.
- Chaput, N., & C. Théry. 2011. *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. Semin Immunopathol **33**:419-440.
- Chavez-Munoz, C., J. Morse, R. Kilani, & A. Ghahary. 2008. *Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes*. J Cell Biochem **104**:2165-2173.
- Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, & H.L. Weiner. 1994. *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis*. Science **265**:1237-1240.
- Chen, Y., J. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V.K. Kuchroo, & H.L. Weiner. 1995. *Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance*. Nature **376**:177-180.
- Chen, K.M., G.L. Wu, Y.H. Wang, C.T. Tian, J. Samaj, F. Baluska, & J.X. Lin. 2008. *The block of intracellular calcium release affects the pollen tube development of Picea wilsonii by changing the deposition of cell wall components*. Protoplasma **233**:39-49.
- Chen, H.Y., Y.M. Lin, H.C. Chung, Y.D. Lang, C.J. Lin, J. Huang, W.C. Wang, F.M. Lin, Z. Chen, H.D. Huang, J.Y. Shyy, J.T. Liang, & R.H. Chen. 2012. *miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4*. Cancer Res **72**:3631-3641.

- Cheung, A.Y., & H.M. Wu. 2008. *Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes*. *Annu Rev Plant Biol* **59**:547-572.
- Chi, H. 2012. *Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions*. *Nat Rev Immunol* **12**:325-338.
- Chiba, Y., S. Onoda, Y. Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, & M. Misawa. 2009. *Upregulation of ADAM8 in the airways of mice with allergic bronchial asthma*. *Lung* **187**:179-185.
- Cho, J.A., Y.S. Lee, S.H. Kim, J.K. Ko, & C.W. Kim. 2009. *MHC independent anti-tumor immune responses induced by Hsp70-enriched exosomes generate tumor regression in murine models*. *Cancer Lett* **275**:256-265.
- Choi, Y.I., J.S. Duke-Cohan, W.B. Ahmed, M.A. Handley, F. Mann, J.A. Epstein, L.K. Clayton, & E.L. Reinherz. 2008. *PlexinD1 glycoprotein controls migration of positively selected thymocytes into the medulla*. *Immunity* **29**:888-898.
- Chong, P.L., & P.T. Wong. 1993. *Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study*. *Biochim Biophys Acta* **1149**:260-266.
- Chowdhury, M.M., C. Dosche, H.G. Lohmannsroben, & S. Leimkuhler. 2012. *Dual role of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MOCS3 in tRNA thiolation and molybdenum cofactor biosynthesis in humans*. *J Biol Chem* **287**:17297-17307.
- Chua, K.Y., G.A. Stewart, W.R. Thomas, R.J. Simpson, R.J. Dilworth, T.M. Plozza, & K.J. Turner. 1988. *Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases*. *J Exp Med* **167**:175-182.
- Clark, S.W., & D.I. Meyer. 1992. *Centractin is an actin homologue associated with the centrosome*. *Nature* **359**:246-250.
- Clayton, A., A. Turkes, H. Navabi, M.D. Mason, & Z. Tabi. 2005. *Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes*. *J Cell Sci* **118**:3631-3638.
- Clayton, C., & A. Estevez. 2011. *The exosomes of trypanosomes and other protists*. *Adv Exp Med Biol* **702**:39-49.
- Coca, F.A. 1923. *Atopia*. *J Immunol* **VIII**. 166. OED.
- Cocucci, E., G. Racchetti, & J. Meldolesi. 2009. *Shedding microvesicles: artefacts no more*. *Trends Cell Biol* **19**:43-51.
- Coffman, R.L., H.F. Savelkoul, & D.A. Leberman. 1989. *Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression*. *Semin Immunol* **1**:55-63.
- Cohenford, M.A., & B. Rigas. 1998. *Cytologically normal cells from neoplastic cervical samples display extensive structural abnormalities on IR spectroscopy: implications for tumor biology*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15327-15332.
- Cokic, V.P., B. Bhattacharya, B.B. Beleslin-Cokic, C.T. Noguchi, R.K. Puri, & A.N. Schechter. 2012. *JAK-STAT and AKT pathway-coupled genes in erythroid progenitor cells through ontogeny*. *J Transl Med* **10**:116.
- Collins, A., A. Warrington, K.A. Taylor, & T. Svitkina. 2011. *Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis*. *Curr Biol* **21**:1167-1175.
- Cooke, R.A., Barnard, J.H., S. Jebald, & A. Stull. 1935. *Serological immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever)*. *J Exp Med* **62**:733-750.
- Conde-Vancells, J., E. Rodríguez-Suarez, N. Embade, D. Gil, R. Matthiesen, M. Valle, F. Elortza, S.C. Lu, J.M. Mato, & J.M. Falcon-Perez. 2008. *Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes*. *J Proteome Res* **7**:5157-5166.

- Conde-Vancells, J., E. Rodríguez-Suarez, E. González, A. Berisa, D. Gil, N. Embade, M. Valle, Z. Luka, F. Elortza, C. Wagner, S.C. Lu, J.M. Mato, & M. Falcon-Perez. 2010. *Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples*. *Proteomics Clin Appl* **4**:416-425.
- Connell, J.T. 1968. *Quantitative intranasal pollen challenge. II. Effect of daily pollen challenge, environmental pollen exposure, and placebo challenge on the nasal membrane*. *J Allergy* **41**:123-139.
- Cooke, R.A., J.H. Barnard, S. Hebald, & A. Stull. 1935. *Serological Evidence of Immunity with Coexisting Sensitization in a Type of Human Allergy (Hay Fever)*. *J Exp Med* **62**:733-750.
- Cope, G.A., & R.J. Deshaies. 2003. *COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases*. *Cell* **114**:663-671.
- Corren, J. 2011. *Cytokine inhibition in severe asthma: current knowledge and future directions*. *Curr Opin Pulm Med* **17**:29-33.
- Cowland, J.B., & N. Borregaard. 1997. *Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans*. *Genomics* **45**:17-23.
- Creticos, P.S., J.T. Schroeder, R.G. Hamilton, S.L. Balcer-Whaley, A.P. Khattignavong, R. Lindblad, H. Li, R. Coffman, V. Seyfert, J.J. Eiden, D. Broide, & Immune Tolerance Network Group. 2006. *Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis*. *N Engl J Med* **355**:1445-1455.
- Croce, C.M. 2009. *Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer*. *Nat Rev Genet* **10**:704-714.
- Croft, M. 2003. *Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27*. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**:265-273.
- Czystowska, M., J. Han, M.J. Szczepanski, M. Szajnik, K. Quadrini, H. Brandwein, J.W. Hadden, K. Signorelli, & T.L. Whiteside. 2009. *IRX-2, a novel immunotherapeutic, protects human T cells from tumor-induced cell death*. *Cell Death Differ* **16**:708-718.
- D'Amato, G., F.T. Spiekma, G. Liccardi, S. Jager, M. Russo, K. Kontou-Fili, H. Nikkels, B. Wuthrich, & S. Bonini. 1998. *Pollen-related allergy in Europe*. *Allergy* **53**:567-578.
- D'Souza-Schorey, C., & P. Chavrier. 2006. *ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:347-358.
- da Silva Correia, J., Y. Miranda, N. Leonard, & R.J. Ulevitch. 2007. *The subunit CSN6 of the COP9 signalosome is cleaved during apoptosis*. *J Biol Chem* **282**:12557-12565.
- Dai, S., T. Wan, B. Wang, X. Zhou, F. Xiu, T. Chen, Y. Wu, & X. Cao. 2005. *More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells*. *Clin Cancer Res* **11**:7554-7563.
- Dai, S., L. Li, T. Chen, K. Chong, Y. Xue, & T. Wang. 2006a. *Proteomic analyses of Oryza sativa mature pollen reveal novel proteins associated with pollen germination and tube growth*. *Proteomics* **6**:2504-2529.
- Dai, S., X. Zhou, B. Wang, Q. Wang, Y. Fu, T. Chen, T. Wan, Y. Yu, & X. Cao. 2006b. *Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A*0201-restricted CEA-specific CD8(+) CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells*. *J Mol Med (Berl)* **84**:1067-1076.
- Dai, S., D. Wei, Z. Wu, X. Zhou, X. Wei, H. Huang, & G. Li. 2008. *Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer*. *Mol Ther* **16**:782-790.
- Dalby, A.R., I. Emam, & R. Franke. 2012. *Analysis of gene expression data from non-small cell lung carcinoma cell lines reveals distinct sub-classes from those identified at the phenotype level*. *PLoS One* **7**:e50253.

- de Gassart, A., C. Geminard, B. Fevrier, G. Raposo, & M. Vidal. 2003. *Lipid raft-associated protein sorting in exosomes*. *Blood* **102**:4336-4344.
- De Linares, C., D. Nieto-Lugilde, F. Alba, C. Díaz de la Guardia, C. Galan, & M.M. Trigo. 2007. *Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to Olea europaea pollen in S Spain*. *Clin Exp Allergy* **37**:125-132.
- De Linares, C., C. Díaz de la Guardia, D. Nieto Lugilde, & F. Alba. 2010. *Airborne study of grass allergen (Lol p 1) in different-sized particles*. *Int Arch Allergy Immunol* **152**:49-57.
- De Week, A.L., M.L. Sanz, P.M. Gamboa, W. Aberer, J. Bienvenu, M. Blanca, P. Demoly, D.G. Ebo, L. Mayorga, G. Monneret, & J. Sainte Laudy. 2008. *Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. II. Technical issues*. *J Investig Allergol Clin Immunol* **18**:143-155.
- del Pozo, M.A., M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, J.M. Serrador, & F. Sánchez-Madrid. 1999. *Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes*. *Eur J Immunol* **29**:3609-3620.
- Deng, Z., R. Pardi, W. Cheadle, X. Xiang, S. Zhang, S.V. Shah, W. Grizzle, D. Miller, J. Mountz, & H.G. Zhang. 2011. *Plant homologue constitutive photomorphogenesis 9 (COP9) signalosome subunit CSN5 regulates innate immune responses in macrophages*. *Blood* **117**:4796-4804.
- Denzer, K., M.J. Kleijmeer, H.F. Heijnen, W. Stoorvogel, & H.J. Geuze. 2000. *Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device*. *J Cell Sci* **113 Pt 19**:3365-3374.
- Deregibus, M.C., V. Cantaluppi, R. Calogero, M. Lo Iacono, C. Tetta, L. Biancone, S. Bruno, B. Bussolati, & G. Camussi. 2007. *Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA*. *Blood* **110**:2440-2448.
- Devlin, J.J., A.M. Lew, R.A. Flavell, & J.E. Coligan. 1985. *Secretion of a soluble class I molecule encoded by the Q10 gene of the C57BL/10 mouse*. *EMBO J* **4**:369-374.
- Dharajiya, N.G., A. Bacsi, I. Boldogh, & S. Sur. 2007. *Pollen NAD(P)H oxidases and their contribution to allergic inflammation*. *Immunol Allergy Clin North Am* **27**:45-63.
- Di Valentin, E., Crahay, C., Garbacki, N., Hennuy, B., Guéders, M., Noël, A., Foidart, J.M., Grooten, J., J. Piette, & D. Cataldo. 2009. *New asthma biomarkers: lessons from murine models of acute and chronic asthma*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**:185197.
- Ding, Y., J. Wang, Y.D. Stierhof, D.G. Robinson, & L. Jiang. 2012. *Unconventional protein secretion*. *Trends Plant Sci* **17**:606-615.
- Diniz, M.G., C.C. Gomes, W.H. de Castro, A.L. Guimaraes, A.M. De Paula, H. Amm, C. Ren, M. MacDougall, & R.S. Gómez. 2012. *miR-15a/16-1 influences BCL2 expression in keratocystic odontogenic tumors*. *Cell Oncol (Dordr)* **35**:285-291.
- Doherty, G.J., & H.T. McMahon. 2009. *Mechanisms of endocytosis*. *Annu Rev Biochem* **78**:857-902.
- Donaldson, J.G. 2003. *Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane*. *J Biol Chem* **278**:41573-41576.
- Douwes, J., D. McLean, T. Slater, N. Travier, S. Cheng, & N. Pearce. 2006. *Pine dust, atopy and lung function: A cross-sectional study in sawmill workers*. *Eur Respir J* **28**:791-798.
- Down, M.J., S. Arkle, & J.J. Mills. 2007. *Regulation and induction of CYP3A11, CYP3A13 and CYP3A25 in C57BL/6J mouse liver*. *Arch Biochem Biophys* **457**:105-110.
- Dresselhaus, T., A. Lausser, & M.L. Marton. 2011. *Using maize as a model to study pollen tube growth and guidance, cross-incompatibility and sperm delivery in grasses*. *Ann Bot* **108**:727-737.

- D'Souza-Schorey, C., & P. Chavrier. 2006. *ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**:347-358.
- Dulac, C., & A.T. Torello. 2003. *Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour*. *Nat Rev Neurosci* **4**:551-562.
- Dungu, J.N., L.J. Anderson, C.J. Whelan, & P.N. Hawkins. 2012. *Cardiac transthyretin amyloidosis*. *Heart* **98**:1546-1554.
- Durham, S.R., S.M. Walker, E.M. Varga, M.R. Jacobson, F. O'Brien, W. Noble, S.J. Till, Q.A. Hamid, & K.T. Nouri-Aria. 1999. *Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy*. *N Engl J Med* **341**:468-475.
- Eberlein-König, B., S. Ullmann, P. Thomas, & B. Przybilla. 1995. *Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization*. *Clin Exp Allergy* **25**:704-712.
- Ebner, C., R. Hirschwehr, L. Bauer, H. Breiteneder, R. Valenta, H. Ebner, D. Kraft, & O. Scheiner. 1995. *Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with the important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin)*. *J Allergy Clin Immunol* **95**:962-969.
- Edlmayr, J., K. Niespodziana, B. Linhart, M. Focke-Tejkl, K. Westritschnig, S. Scheiblhofer, A. Stoecklinger, M. Kneidinger, P. Valent, R. Campana, J. Thalhamer, T. Popow-Kraupp, & R. Valenta. 2009. *A combination vaccine for allergy and rhinovirus infections based on rhinovirus-derived surface protein VP1 and a nonallergenic peptide of the major timothy grass pollen allergen Phl p 1*. *J Immunol* **182**:6298-6306.
- Ehrchen, J.M., C. Sunderkotter, D. Foell, T. Vogl, & J. Roth. 2009. *The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer*. *J Leukoc Biol* **86**:557-566.
- Ehrenreiter, K., D. Piazzolla, V. Velamoor, I. Sobczak, J.V. Small, J. Takeda, T. Leung, & M. Baccarini. 2005. *Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration*. *J Cell Biol* **168**:955-964.
- Eldh, M., K. Ekstrom, H. Valadi, M. Sjostrand, B. Olsson, M. Jernas, & J. Lotvall. 2010. *Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA*. *PLoS One* **5**:e15353.
- Emberlin, J. 1995. *Plant allergens on pauci-micronic airborne particles*. *Clin Exp Allergy* **25**:202-205.
- Entchev, E.V., & M.A. González-Gaitán. 2002. *Morphogen gradient formation and vesicular trafficking*. *Traffic* **3**:98-109.
- Eriksson, K., & J. Holmgren. 2002. *Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants*. *Curr Opin Immunol* **14**:666-672.
- Eriksson, J.E., T. Dechat, B. Grin, B. Helfand, M. Mendez, H.M. Pallari, & R.D. Goldman. 2009. *Introducing intermediate filaments: from discovery to disease*. *J Clin Invest* **119**:1763-1771.
- Erpenbeck, V.J., M. Ziegert, D. Cavalet-Blanco, C. Martin, R. Baelder, T. Glaab, A. Braun, W. Steinhilber, B. Luettig, S. Uhlig, H.G. Hoymann, N. Krug, & J.M. Hohlfeld. 2006. *Surfactant protein D inhibits early airway response in Aspergillus fumigatus-sensitized mice*. *Clin Exp Allergy* **36**:930-940.
- Erukhimovitch, V., I. Mukmanov, M. Talyshinsky, Y. Souprun, & M. Huleihel. 2004. *The use of FTIR microscopy for evaluation of herpes viruses infection development kinetics*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **60**:2355-2361.
- Escrevente, C., S. Keller, P. Altevogt, & J. Costa. 2011. *Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells*. *BMC Cancer* **11**:108.

- Escudier, B., T. Dorval, N. Chaput, F. André, M.P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulaire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J.B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin, & L. Zitvogel. 2005. *Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial*. *J Transl Med* **3**:10.
- Esquela-Kerscher, A., & F.J. Slack. 2006. *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. *Nat Rev Cancer* **6**:259-269.
- Essendoubi, M., D. Toubas, M. Bouzaggou, J.M. Pinon, M. Manfait, & G.D. Sockalingum. 2005. *Rapid identification of Candida species by FT-IR microspectroscopy*. *Biochim Biophys Acta* **1724**:239-247.
- Esser, J., U. Gehrman, F.L. D'Alexandri, A.M. Hidalgo-Estevez, C.E. Wheelock, A. Scheynius, S. Gabrielsson, & O. Radmark. 2010. *Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration*. *J Allergy Clin Immunol* **126**:1032-1040, 1040 e1031-1034.
- Ewbank, P.A., J. Murray, K. Sanders, D. Curran-Everett, S. Dreskin, & H.S. Nelson. 2003. *A double-blind, placebo-controlled immunotherapy dose-response study with standardized cat extract*. *J Allergy Clin Immunol* **111**:155-161.
- Fahlbusch, B., D. Hornung, J. Heinrich, H.M. Dahse, & L. Jager. 2000. *Quantification of group 5 grass pollen allergens in house dust*. *Clin Exp Allergy* **30**:1645-1652.
- Fairbanks, G., T.L. Steck, & D.F. Wallach. 1971. *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*. *Biochemistry* **10**:2606-2617.
- Fang, Y., J.L. Xue, Q. Shen, J. Chen, & L. Tian. 2012. *MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma*. *Hepatology* **55**:1852-1862.
- Fauré, J., G. Lachenal, M. Court, J. Hirrlinger, C. Chatellard-Causse, B. Blot, J. Grange, G. Schoehn, Y. Goldberg, V. Boyer, F. Kirchhoff, G. Raposo, J. Garin, & R. Sadoul. 2006. *Exosomes are released by cultured cortical neurones*. *Mol Cell Neurosci* **31**:642-648.
- Feng, D., W.L. Zhao, Y.Y. Ye, X.C. Bai, R.Q. Liu, L.F. Chang, Q. Zhou, & S.F. Sui. 2010. *Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis*. *Traffic* **11**:675-687.
- Feng, L., Y. Xie, H. Zhang, & Y. Wu. 2012. *miR-107 targets cyclin-dependent kinase 6 expression, induces cell cycle G1 arrest and inhibits invasion in gastric cancer cells*. *Med Oncol* **29**:856-863.
- Fernández-González, D., Z. González-Parrado, A.M. Vega-Maray, R.M. Valencia-Barrera, B. Camazon-Izquierdo, P. De Nuntiis, & P. Mandrioli. 2010. *Platanus pollen allergen, Pla a 1: quantification in the atmosphere and influence on a sensitizing population*. *Clin Exp Allergy* **40**:1701-1708.
- Fernández, M.C., A. Olmedilla, J.D. Alché, P. Palomino, C. Lahoz, & M.I. Rodríguez-García. 1996. *Immunogold probes for light and electron microscopic localization of Ole e I in several Oleaceae pollens*. *J Histochem Cytochem* **44**:151-158.
- Fevrier, B., D. Vilette, F. Archer, D. Loew, W. Faigle, M. Vidal, H. Laude, & G. Raposo. 2004. *Cells release prions in association with exosomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9683-9688.
- Finkelman, F.D., S.P. Hogan, G.K. Hershey, M.E. Rothenberg, & M. Wills-Karp. 2010. *Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma*. *J Immunol* **184**:1663-1674.
- Flo, T.H., K.D. Smith, S. Sato, D.J. Rodríguez, M.A. Holmes, R.K. Strong, S. Akira, & A. Aderem. 2004. *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron*. *Nature* **432**:917-921.
- Floistrup, H., J. Swartz, A. Bergstrom, J.S. Alm, A. Scheynius, M. van Hage, M. Waser, C. Braun-Fahrlander, D. Schram-Bijkerk, M. Huber, A. Zutavern, E. von Mutius, E. Ullaggar, J. Riedler, K.B. Michaels, & G.

- Pershagen. 2006. *Allergic disease and sensitization in Steiner school children*. J Allergy Clin Immunol **117**:59-66.
- Florido, J.F., P.G. Delgado, B.S. de San Pedro, J. Quiralte, J.M. de Saavedra, V. Peralta, & L.R. Valenzuela. 1999. *High levels of Olea europaea pollen and relation with clinical findings*. Int Arch Allergy Immunol **119**:133-137.
- Focke, M., V. Mahler, T. Ball, W.R. Sperr, Y. Majlesi, P. Valent, D. Kraft, & R. Valenta. 2001. *Nonanaphylactic synthetic peptides derived from B cell epitopes of the major grass pollen allergen, Phl p 1, for allergy vaccination*. FASEB J **15**:2042-2044.
- Focke, M., B. Linhart, A. Hartl, U. Wiedermann, W.R. Sperr, P. Valent, J. Thalhamer, D. Kraft, & R. Valenta. 2004. *Non-anaphylactic surface-exposed peptides of the major birch pollen allergen, Bet v 1, for preventive vaccination*. Clin Exp Allergy **34**:1525-1533.
- Föger, N., L. Rangell, D.M. Danilenko, & A.C. Chan. 2006. *Requirement for coronin 1 in T lymphocyte trafficking and cellular homeostasis*. Science **313**:839-842.
- Foley, S.C., A.K. Mogas, R. Olivenstein, P.O. Fiset, J. Chakir, J. Bourbeau, P. Ernst, C. Lemiere, J.G. Martin, & Q. Hamid. 2007. *Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma*. J Allergy Clin Immunol **119**:863-871.
- Frazier, M.D., L.B. Mamo, A.J. Ghio, & J.L. Turi. 2011. *Hepcidin expression in human airway epithelial cells is regulated by interferon-gamma*. Respir Res **12**:100.
- Frew, A.J., R.J. Powell, C.J. Corrigan, & S.R. Durham. 2006. *Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis*. J Allergy Clin Immunol **117**:319-325.
- Friedman, A., & H.L. Weiner. 1994. *Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage*. Proc Natl Acad Sci U S A **91**:6688-6692.
- Friedman, R.C., K.K. Farh, C.B. Burge, & D.P. Bartel. 2009. *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res **19**:92-105.
- Fujita, M., F. Reinhart, & M. Neutra. 1990. *Convergence of apical and basolateral endocytic pathways at apical late endosomes in absorptive cells of suckling rat ileum in vivo*. J Cell Sci **97** (Pt 2):385-394.
- Furrie, E., M.W. Turner, & S. Strobel. 1994. *Failure of SCID mice to generate an oral tolerogen after a feed of ovalbumin: a role for a functioning gut-associated lymphoid system*. Immunology **83**:562-567.
- Furrie, E., M.W. Turner, & S. Strobel. 1995. *Partial characterization of a circulating tolerogenic moiety which, after a feed of ovalbumin, suppresses delayed-type hypersensitivity in recipient mice*. Immunology **86**:480-486.
- Futter, C.E., A. Pearse, L.J. Hewlett, & C.R. Hopkins. 1996. *Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes*. J Cell Biol **132**:1011-1023.
- Galán, C., Cariñanos, P., P. Alcazar, & E. Domínguez. 2007. Manual de calidad y gestión de la Red Española de Aerobiología, REA. Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba
- Gamboa, P.M., O. Caceres, I. Antepara, R. Sánchez-Monge, O. Ahrazem, G. Salcedo, D. Barber, M. Lombardero, & M.L. Sanz. 2007. *Two different profiles of peach allergy in the north of Spain*. Allergy **62**:408-414.
- Gang, D.R., H. Kasahara, Z.Q. Xia, K. Vander Mijnsbrugge, G. Bauw, W. Boerjan, M. Van Montagu, L.B. Davin, & N.G. Lewis. 1999. *Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases*. J Biol Chem **274**:7516-7527.

- Gangl, K., R. Reininger, D. Bernhard, R. Campana, I. Pree, J. Reisinger, M. Kneidinger, M. Kundi, H. Dolznig, D. Thurnher, P. Valent, K.W. Chen, S. Vrtala, S. Spitzauer, R. Valenta, & V. Niederberger. 2009. *Cigarette smoke facilitates allergen penetration across respiratory epithelium*. *Allergy* **64**:398-405.
- Ganglberger, E., K. Grunberger, U. Wiedermann, M. Vermes, B. Sponer, H. Breiteneder, O. Scheiner, G. Boltz, & E. Jensen-Jarolim. 2001. *IgE mimotopes of birch pollen allergen Bet v 1 induce blocking IgG in mice*. *Int Arch Allergy Immunol* **124**:395-397.
- Gao, X., R. Zhang, X. Qu, M. Zhao, S. Zhang, H. Wu, L. Jianyong, & L. Chen. 2012. *MiR-15a, miR-16-1 and miR-17-92 cluster expression are linked to poor prognosis in multiple myeloma*. *Leuk Res* **36**:1505-1509.
- Garbacki, N., E. Di Valentin, V.A. Huynh-Thu, P. Geurts, A. Irrthum, C. Crahay, T. Arnould, C. Deroanne, J. Piette, D. Cataldo, & A. Colige. 2011. *MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets*. *PLoS One* **6**:e16509.
- Garbis, S., G. Lubec, & M. Fountoulakis. 2005. *Limitations of current proteomics technologies*. *J Chromatogr A* **1077**:1-18.
- Gaspar, R., J. Dewelle, R. Kiss, T. Mijatovic, & E. Goormaghtigh. 2009. *IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures*. *Biochim Biophys Acta* **1788**:1263-1270.
- Gasser, O., C. Hess, S. Miot, C. Deon, J.C. Sánchez, & J.A. Schifferli. 2003. *Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils*. *Exp Cell Res* **285**:243-257.
- Gastaminza, G., M. Lombardero, G. Bernaola, I. Antepara, D. Munoz, P.M. Gamboa, M.T. Audicana, C. Marcos, & I.J. Ansotegui. 2009. *Allergenicity and cross-reactivity of pine pollen*. *Clin Exp Allergy* **39**:1438-1446.
- Gastpar, R., M. Gehrman, M.A. Bausero, A. Asea, C. Gross, J.A. Schroeder, & G. Multhoff. 2005. *Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells*. *Cancer Res* **65**:5238-5247.
- Geller-Bernstein, C., G. Arad, N. Keynan, C. Lahoz, B. Cárda, & Y. Waisel. 1996. *Hypersensitivity to pollen of Olea europaea in Israel*. *Allergy* **51**:356-359.
- Ghosh, A.K., G. Ramakrishnan, C. Chandramohan, & R. Rajasekharan. 2008. *CGI-58, the causative gene for Chanarin-Dorfman syndrome, mediates acylation of lysophosphatidic acid*. *J Biol Chem* **283**:24525-24533.
- Gibbins, D.J., C. Ciaudo, M. Erhardt, & O. Voinnet. 2009. *Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity*. *Nat Cell Biol* **11**:1143-1149.
- Gidaro, G.B., F. Marcucci, L. Sensi, C. Incorvaia, F. Frati, & G. Ciprandi. 2005. *The safety of sublingual-swallow immunotherapy: an analysis of published studies*. *Clin Exp Allergy* **35**:565-571.
- Gilles, S., V. Mariani, M. Bryce, M.J. Mueller, J. Ring, H. Behrendt, T. Jakob, & C. Traidl-Hoffmann. 2009. *Pollen allergens do not come alone: pollen associated lipid mediators (PALMS) shift the human immune systems towards a T(H)2-dominated response*. *Allergy Asthma Clin Immunol* **5**:3.
- Gilles, S., A. Fekete, X. Zhang, I. Beck, C. Blume, J. Ring, C. Schmidt-Weber, H. Behrendt, P. Schmitt-Kopplin, & C. Traidl-Hoffmann. 2011. *Pollen metabolome analysis reveals adenosine as a major regulator of dendritic cell-primed T(H) cell responses*. *J Allergy Clin Immunol* **127**:454-461 e451-459.
- Giri, P.K., & J.S. Schorey. 2008. *Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo*. *PLoS One* **3**:e2461.
- Giudice, E.L., & J.D. Campbell. 2006. *Needle-free vaccine delivery*. *Adv Drug Deliv Rev* **58**:68-89.

- Glasser, S.W., T.L. Witt, A.P. Senft, J.E. Baatz, D. Folger, M.D. Maxfield, H.T. Akinbi, D.A. Newton, D.R. Prows, & T.R. Korfhagen. 2009. *Surfactant protein C-deficient mice are susceptible to respiratory syncytial virus infection*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**:L64-72.
- Gleich, G.J., E.M. Zimmermann, L.L. Henderson, & J.W. Yunginger. 1982. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* **70**:261-271.
- Glickman, M.H., & A. Ciechanover. 2002. *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. *Physiol Rev* **82**:373-428.
- Gokhale, A., R. Kunder, A. Goel, R. Sarin, A. Moiyadi, A. Shenoy, C. Mamidipally, S. Noronha, S. Kannan, & N.V. Shirsat. 2010. *Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway*. *J Cancer Res Ther* **6**:521-529.
- Goldenberg, N.M., S. Grinstein, & M. Silverman. 2007. *Golgi-bound Rab34 is a novel member of the secretory pathway*. *Mol Biol Cell* **18**:4762-4771.
- Gonzales, P., T. Pisitkun, & M.A. Knepper. 2008. *Urinary exosomes: is there a future?* *Nephrol Dial Transplant* **23**:1799-1801.
- Gonzales, P.A., T. Pisitkun, J.D. Hoffert, D. Tchapyjnikov, R.A. Star, R. Kleta, N.S. Wang, & M.A. Knepper. 2009. *Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes*. *J Am Soc Nephrol* **20**:363-379.
- González-Begne, M., B. Lu, X. Han, F.K. Hagen, A.R. Hand, J.E. Melvin, & J.R. Yates. 2009. *Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT)*. *J Proteome Res* **8**:1304-1314.
- González, E., R.I. Monsalve, X.S. Puente, M. Villalba, & R. Rodríguez. 2000. *Assignment of the disulfide bonds of Ole e 1, a major allergen of olive tree pollen involved in fertilization*. *J Pept Res* **55**:18-23.
- González, E., M. Villalba, & R. Rodríguez. 2001. *Immunological and molecular characterization of the major allergens from lilac and privet pollens overproduced in Pichia pastoris*. *Clin Exp Allergy* **31**:313-321.
- González, E.M., M. Villalba, M. Lombardero, M. Aalbers, R. van Ree, & R. Rodríguez. 2002. *Influence of the 3D-conformation, glycan component and microheterogeneity on the epitope structure of Ole e 1, the major olive allergen. Use of recombinant isoforms and specific monoclonal antibodies as immunological tools*. *Mol Immunol* **39**:93-101.
- González, E.M., M. Villalba, J. Quiralte, E. Batanero, F. Roncal, J.P. Albar, & R. Rodríguez. 2006. *Analysis of IgE and IgG B-cell immunodominant regions of Ole e 1, the main allergen from olive pollen*. *Mol Immunol* **43**:570-578.
- Goormaghtigh, E., V. Raussens, & J.M. Ruysschaert. 1999. *Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes*. *Biochim Biophys Acta* **1422**:105-185.
- Gorelik, L., & R.A. Flavell. 2000. *Abrogation of TGFβ signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease*. *Immunity* **12**:171-181.
- Goshima, Y., Y. Sasaki, N. Yamashita, & F. Nakamura. 2012. *Class 3 semaphorins as a therapeutic target*. *Expert Opin Ther Targets* **16**:933-944.
- Gotoh, N., S. Laks, M. Nakashima, I. Lax, & J. Schlessinger. 2004. *FRS2 family docking proteins with overlapping roles in activation of MAP kinase have distinct spatial-temporal patterns of expression of their transcripts*. *FEBS Lett* **564**:14-18.
- Graner, M.W., O. Alzate, A.M. Dechkovskaia, J.D. Keene, J.H. Sampson, D.A. Mitchell, & D.D. Bigner. 2009. *Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes*. *FASEB J* **23**:1541-1557.

- Greco, V., M. Hannus, & S. Eaton. 2001. *Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia*. *Cell* **106**:633-645.
- Greengard, O., J.F. Head, & S.L. Goldberg. 1980. *Uridine kinase, adenylate kinase, and guanase in human lung tumors*. *Cancer Res* **40**:2295-2299.
- Grimson, A., K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engele, L.P. Lim, & D.P. Bartel. 2007. *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. *Mol Cell* **27**:91-105.
- Grobe, K., W.M. Becker, M. Schlaak, & A. Petersen. 1999. *Grass group I allergens (beta-expansins) are novel, papain-related proteinases*. *Eur J Biochem* **263**:33-40.
- Groisman, R., J. Polanowska, I. Kuraoka, J. Sawada, M. Saijo, R. Drapkin, A.F. Kisselev, K. Tanaka, & Y. Nakatani. 2003. *The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage*. *Cell* **113**:357-367.
- Grote, M., S. Vrtala, & R. Valenta. 1993. *Monitoring of two allergens, Bet v I and profilin, in dry and rehydrated birch pollen by immunogold electron microscopy and immunoblotting*. *J Histochem Cytochem* **41**:745-750.
- Grote, M., S. Vrtala, V. Niederberger, R. Valenta, & R. Reichelt. 2000. *Expulsion of allergen-containing materials from hydrated rye grass (*Lolium perenne*) pollen revealed by using immunogold field emission scanning and transmission electron microscopy*. *J Allergy Clin Immunol* **105**:1140-1145.
- Grote, M., S. Vrtala, V. Niederberger, R. Wiermann, R. Valenta, & R. Reichelt. 2001. *Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy*. *J Allergy Clin Immunol* **108**:109-115.
- Grote, M., R. Valenta, & R. Reichelt. 2003. *Abortive pollen germination: a mechanism of allergen release in birch, alder, and hazel revealed by immunogold electron microscopy*. *J Allergy Clin Immunol* **111**:1017-1023.
- Gruenberg, J., & F.R. Maxfield. 1995. *Membrane transport in the endocytic pathway*. *Curr Opin Cell Biol* **7**:552-563.
- Grunig, G., M. Warnock, A.E. Wakil, R. Venkayya, F. Brombacher, D.M. Rennick, D. Sheppard, M. Mohrs, D.D. Donaldson, R.M. Locksley, & D.B. Corry. 1998. *Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma*. *Science* **282**:2261-2263.
- Gu, A.D., Y. Wang, L. Lin, S.S. Zhang, & Y.Y. Wan. 2012. *Requirements of transcription factor Smad-dependent and -independent TGF-beta signaling to control discrete T-cell functions*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:905-910.
- Guglani, L., R. Gopal, J. Rangel-Moreno, B.F. Junecko, Y. Lin, T. Berger, T.W. Mak, J.F. Alcorn, T.D. Randall, T.A. Reinhart, Y.R. Chan, & S.A. Khader. 2012. *Lipocalin 2 regulates inflammation during pulmonary mycobacterial infections*. *PLoS One* **7**:e50052.
- Guo, J.X., Q.S. Tao, P.R. Lou, X.C. Chen, J. Chen, & G.B. Yuan. 2012. *miR-181b as a potential molecular target for anticancer therapy of gastric neoplasms*. *Asian Pac J Cancer Prev* **13**:2263-2267.
- Haagsman, H.P., & R.V. Diemel. 2001. *Surfactant-associated proteins: functions and structural variation*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**:91-108.
- Haahtela, T., L. von Hertzen, M. Makela, & M. Hannuksela. 2008. *Finnish Allergy Programme 2008-2018-time to act and change the course*. *Allergy* **63**:634-645.
- Haahtela, T., E. Valovirta, P. Kauppi, E. Tommila, K. Saarinen, L. von Hertzen, & M.J. Makela. 2012. *The Finnish Allergy Programme 2008-2018 - scientific rationale and practical implementation*. *Asia Pac Allergy* **2**:275-279.

- Halic, M., M. Gartmann, O. Schlenker, T. Mielke, M.R. Pool, I. Sinning, & R. Beckmann. 2006. *Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site*. *Science* **312**:745-747.
- Hammad, H., & B.N. Lambrecht. 2008. *Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma*. *Nat Rev Immunol* **8**:193-204.
- Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M.A. Willart, R.N. Germain, & B.N. Lambrecht. 2009. *House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells*. *Nat Med* **15**:410-416.
- Hamman-Khalifa, A., A.J. Castro, J.C. Jimenez-Lopez, M.I. Rodríguez-García, & J.D. Alché. 2008. *Olive cultivar origin is a major cause of polymorphism for Ole e 1 pollen allergen*. *BMC Plant Biol* **8**:10.
- Han, J.M., N.H. Kwon, J.Y. Lee, S.J. Jeong, H.J. Jung, H.R. Kim, Z. Li, & S. Kim. 2010. *Identification of gp96 as a novel target for treatment of autoimmune disease in mice*. *PLoS One* **5**:e9792.
- Hanson, D.D., D.A. Hamilton, J.L. Travis, D.M. Bashe, & J.P. Mascarenhas. 1989. *Characterization of a pollen-specific cDNA clone from Zea mays and its expression*. *Plant Cell* **1**:173-179.
- Hanson, P.I., & A. Cashikar. 2012. *Multivesicular body morphogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**:337-362.
- Hao, H., Y. Li, Y. Hu, & J. Lin. 2005. *Inhibition of RNA and protein synthesis in pollen tube development of Pinus bungeana by actinomycin D and cycloheximide*. *New Phytol* **165**:721-729.
- Haselden, B.M., A.B. Kay, & M. Larche. 1999. *Immunoglobulin E-independent major histocompatibility complex-restricted T cell peptide epitope-induced late asthmatic reactions*. *J Exp Med* **189**:1885-1894.
- Hata, T., K. Murakami, H. Nakatani, Y. Yamamoto, T. Matsuda, & N. Aoki. 2010. *Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs*. *Biochem Biophys Res Commun* **396**:528-533.
- Hauser, M., A. Roulias, F. Ferreira, & M. Egger. 2010. *Panallergens and their impact on the allergic patient*. *Allergy Asthma Clin Immunol* **6**:1.
- Hawari, F.I., F.N. Rouhani, X. Cui, Z.X. Yu, C. Buckley, M. Kaler, & S.J. Levine. 2004. *Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:1297-1302.
- He, L., & G.J. Hannon. 2004. *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nat Rev Genet* **5**:522-531.
- Heath, V.L., E.E. Murphy, C. Crain, M.G. Tomlinson, & A. O'Garra. 2000. *TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression*. *Eur J Immunol* **30**:2639-2649.
- Hedlund, M., A.C. Stenqvist, O. Nagaeva, L. Kjellberg, M. Wulff, V. Baranov, & L. Mincheva-Nilsson. 2009. *Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function*. *J Immunol* **183**:340-351.
- Hegmans, J.P., M.P. Bard, A. Hemmes, T.M. Luider, M.J. Kleijmeer, J.B. Prins, L. Zitvogel, S.A. Burgers, H.C. Hoogsteden, & B.N. Lambrecht. 2004. *Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells*. *Am J Pathol* **164**:1807-1815.
- Heijnen, H.F., A.E. Schiel, R. Fijnheer, H.J. Geuze, & J.J. Sixma. 1999. *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules*. *Blood* **94**:3791-3799.
- Helfand, B.T., Y.H. Chou, D.K. Shumaker, & R.D. Goldman. 2005. *Intermediate filament proteins participate in signal transduction*. *Trends Cell Biol* **15**:568-570.

- Hepler, P.K., L. Vidali, & A.Y. Cheung. 2001. *Polarized cell growth in higher plants*. Annu Rev Cell Dev Biol **17**:159-187.
- Herrmann, H., H. Bar, L. Kreplak, S.V. Strelkov, & U. Aebi. 2007. *Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics*. Nat Rev Mol Cell Biol **8**:562-573.
- Hess, J., P. Angel, & M. Schorpp-Kistner. 2004. *AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings*. J Cell Sci **117**:5965-5973.
- Higuchi, Y., A. Yasui, K. Matsuura, & S. Yamamoto. 2002. *CD156 transgenic mice. Different responses between inflammatory types*. Pathobiology **70**:47-54.
- Hochreiter, R., T. Stepanoska, F. Ferreira, R. Valenta, S. Vrtala, J. Thalhamer, & A. Hartl. 2003. *Prevention of allergen-specific IgE production and suppression of an established Th2-type response by immunization with DNA encoding hypoallergenic allergen derivatives of Bet v 1, the major birch-pollen allergen*. Eur J Immunol **33**:1667-1676.
- Hoffmann-Sommergruber, K., G. O'Riordain, H. Ahorn, C. Ebner, M. Laimer Da Camara Machado, H. Pühringer, O. Scheiner, & H. Breiteneder. 1999. *Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1*. Clin Exp Allergy **29**:840-847.
- Holgate, S.T., P.M. Lackie, D.E. Davies, W.R. Roche, & A.F. Walls. 1999. *The bronchial epithelium as a key regulator of airway inflammation and remodelling in asthma*. Clin Exp Allergy **29 Suppl 2**:90-95.
- Holgate, S.T., P. Lackie, S. Wilson, W. Roche, & D. Davies. 2000. *Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma*. Am J Respir Crit Care Med **162**:S113-117.
- Holgate, S.T., & R. Polosa. 2008. *Treatment strategies for allergy and asthma*. Nat Rev Immunol **8**:218-230.
- Holmes-Davis, R., C.K. Tanaka, W.H. Vensel, W.J. Hurkman, & S. McCormick. 2005. *Proteome mapping of mature pollen of Arabidopsis thaliana*. Proteomics **5**:4864-4884.
- Holmgren, J., A.M. Harandi, & C. Czerkinsky. 2003. *Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA*. Expert Rev Vaccines **2**:205-217.
- Holt, G.H., K.J. Turner, & B.J. Holt. 1981. *In vitro synthesis of IgE by human peripheral blood leucocytes. II modulation of IgE B cell activity by isotype-specific regulatory T cells*. Clin Exp Immunol **45**:523-531.
- Holleran, E.A., L.A. Ligon, M. Tokito, M.C. Stankewich, J.S. Morrow, & E.L. Holzbaur. 2001. *beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin*. J Biol Chem **276**:36598-36605.
- Hongjia, L., G. Qingling, L. Meiyang, W. Weixuan, Z. Lihong, G. Yongsheng, L. Yanli, W. Jinxiang, & D. Liang. 2010. *House dust mite regulate the lung inflammation of asthmatic mice through TLR4 pathway in airway epithelial cells*. Cell Biochem Funct **28**:597-603.
- Hori, S., T. Nomura, & S. Sakaguchi. 2003. *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science **299**:1057-1061.
- Howard, M., J. Farrar, M. Hilfiker, B. Johnson, K. Takatsu, T. Hamaoka, & W.E. Paul. 1982. *Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2*. J Exp Med **155**:914-923.
- Hsieh, I.S., K.C. Chang, Y.T. Tsai, J.Y. Ke, P.J. Lu, K.H. Lee, S.D. Yeh, T.M. Hong, & Y.L. Chen. 2013. *MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Carcinogenesis **34**:530-538.

- Hsu, D.H., P. Paz, G. Villalflor, A. Rivas, A. Mehta-Damani, E. Angevin, L. Zitvogel, & J.B. Le Pecq. 2003. *Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides*. J Immunother **26**:440-450.
- Hsu, C., Y. Morohashi, S. Yoshimura, N. Manrique-Hoyos, S. Jung, M.A. Lauterbach, M. Bakhti, M. Gronborg, W. Mobius, J. Rhee, F.A. Barr, & M. Simons. 2010. *Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C*. J Cell Biol **189**:223-232.
- Hu, Y., Q. Dong, & D. Yu. 2012. *Arabidopsis WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen Pseudomonas syringae*. Plant Sci **185-186**:288-297.
- Huang, B.B., B.K. Bonish, V. Chaturvedi, J.Z. Qin, & B.J. Nickoloff. 2001. *Keratinocyte CDw60 expression is modulated by both a Th-1 type cytokine IFN-gamma and Th-2 cytokines IL-4 and IL-13: relevance to psoriasis*. J Invest Dermatol **116**:305-312.
- Huang, L., N. Gotoh, S. Zhang, M. Shibuya, T. Yamamoto, & N. Tsuchida. 2004. *SNT-2 interacts with ERK2 and negatively regulates ERK2 signaling in response to EGF stimulation*. Biochem Biophys Res Commun **324**:1011-1017.
- Huang, Y., & J.K. Burkhardt. 2007. *T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms*. J Cell Sci **120**:723-730.
- Huecas, S., M. Villalba, E. González, A. Martínez-Ruiz, & R. Rodríguez. 1999. *Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast Pichia pastoris*. Eur J Biochem **261**:539-546.
- Huecas, S., M. Villalba, & R. Rodríguez. 2001. *Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3-beta-glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity*. J Biol Chem **276**:27959-27966.
- Hunter, M.P., N. Ismail, X. Zhang, B.D. Aguda, E.J. Lee, L. Yu, T. Xiao, J. Schafer, M.L. Lee, T.D. Schmittgen, S.P. Nana-Sinkam, D. Jarjoura, & C.B. Marsh. 2008. *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. PLoS One **3**:e3694.
- Hyder, C.L., H.M. Pallari, V. Kochin, & J.E. Eriksson. 2008. *Providing cellular signposts-post-translational modifications of intermediate filaments*. FEBS Lett **582**:2140-2148.
- Hyung, S.J., S. Deroo, & C.V. Robinson. 2010. *Retinol and retino-binding protein stabilize transthyretin via formation of retinol transport complex*. ACS Chem Bio **5**:1137-1146.
- Ichikawa, D., M. Mizuno, T. Yamamura, & S. Miyake. 2011. *GRAIL (gene related to anergy in lymphocytes) regulates cytoskeletal reorganization through ubiquitination and degradation of Arp2/3 subunit 5 and coronin 1A*. J Biol Chem **286**:43465-43474.
- Iliev, D.B., S.M. Jorgensen, M. Rode, A. Krasnov, I. Harneshaug, & J.B. Jorgensen. 2010. *CpG-induced secretion of MHCIIbeta and exosomes from salmon (Salmo salar) APCs*. Dev Comp Immunol **34**:29-41.
- Inayat, S., A. Larsson, G.K. Ronquist, G. Ronquist, N. Egberg, R. Eliasson, & L. Carlsson. 2012. *High levels of cathepsins B, L and S in human seminal plasma and their association with prostasomes*. Andrologia **44**:423-427.
- Ishii, T., J. Hirota, & P. Mombaerts. 2003. *Combinatorial coexpression of neural and immune multigene families in mouse vomeronasal sensory neurons*. Curr Biol **13**:394-400.
- Ishii, T., & P. Mombaerts. 2008. *Expression of nonclassical class I major histocompatibility genes defines a tripartite organization of the mouse vomeronasal system*. J Neurosci **28**:2332-2341.
- Ishizaka, K., T. Ishizaka, & M.M. Hornbrook. 1966. *Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody*. J Immunol **97**:840-853.

- Islam, A., X. Shen, T. Hiroi, J. Moss, M. Vaughan, & S.J. Levine. 2007. *The brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein, BIG2, regulates the constitutive release of TNFR1 exosome-like vesicles*. J Biol Chem **282**:9591-9599.
- Ivaska, J., H.M. Pallari, J. Nevo, & J.E. Eriksson. 2007. *Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling*. Exp Cell Res **313**:2050-2062.
- Izquierdo-Useros, N., M.C. Puertas, F.E. Borrás, J. Blanco, & J. Martínez-Picado. 2011. *Exosomes and retroviruses: the chicken or the egg?* Cell Microbiol **13**:10-17.
- Jahn-Schmid, B., M. Graninger, M. Glozik, S. Kupcu, C. Ebner, F.M. Unger, U.B. Sleytr, & P. Messner. 1996. *Immunoreactivity of allergen (Bet v 1) conjugated to crystalline bacterial cell surface layers (S-layers)*. Immunotechnology : an international journal of immunological engineering **2**:103-113.
- Jarnicki, A.G., T. Tsuji, & W.R. Thomas. 2001. *Inhibition of mucosal and systemic T(h)2-type immune responses by intranasal peptides containing a dominant T cell epitope of the allergen Der p 1*. Int Immunol **13**:1223-1231.
- Jato, V., F.J. Rodríguez-Rajo, Z. González-Parrado, B. Elvira-Rendueles, S. Moreno-Grau, A. Vega-Maray, D. Fernández-González, J.A. Asturias, & M. Suarez-Cervera. 2010. *Detection of airborne Par j 1 and Par j 2 allergens in relation to Urticaceae pollen counts in different bioclimatic areas*. Ann Allergy Asthma Immunol **105**:50-56.
- Jensen-Jarolim, E., A. Leitner, R. Hirschwehr, D. Kraft, B. Wuthrich, O. Scheiner, J. Graf, & C. Ebner. 1997. *Characterization of allergens in Apiaceae spices: anise, fennel, coriander and cumin*. Clin Exp Allergy **27**:1299-1306.
- Jia, J.J., X. Zhang, C.R. Ge, & M. Jois. 2009. *The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes*. Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity **10**:519-526.
- Jiménez-Díaz, C. 1932. *El asma y otras enfermedades alérgicas*. Spain. Ed. España.
- Joenvaara, S., P. Mattila, J. Renkonen, A. Makitie, S. Toppila-Salmi, M. Lehtonen, P. Salmi, S. Lehti, J. Mäkinen, R. Sormunen, T. Paavonen, & R. Renkonen. 2009. *Caveolar transport through nasal epithelium of birch pollen allergen Bet v 1 in allergic patients*. J Allergy Clin Immunol **124**:135-142 e131-121.
- Johnson, M.A., & D. Preuss. 2003. *On your mark, get set, GROW! LePRK2-LAT52 interactions regulate pollen tube growth*. Trends Plant Sci **8**:97-99.
- Johnstone, R.M., M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, & C. Turbide. 1987. *Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)*. J Biol Chem **262**:9412-9420.
- Jung, T., D. Castellana, P. Klingbeil, I. Cuesta Hernandez, M. Vitacolonna, D.J. Orlicky, S.R. Roffler, P. Brodt, & M. Zoller. 2009. *CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes*. Neoplasia **11**:1093-1105.
- Jutel, M., U.R. Müller, M. Fricker, S. Rihs, W.J. Pichler, & C. Dahinden. 1996. *Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils*. Clin Exp Allergy **26**:1112-1118.
- Jutel, M., M. Akdis, F. Budak, C. Aebischer-Casaulta, M. Wrzyszczyk, K. Blaser, & C.A. Akdis. 2003. *IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy*. Eur J Immunol **33**:1205-1214.
- Jutel, M., L. Jaeger, R. Suck, H. Meyer, H. Fiebig, & O. Cromwell. 2005. *Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens*. J Allergy Clin Immunol **116**:608-613.

- Kalesnikoff, J., & S.J. Galli. 2008. *New developments in mast cell biology*. Nat Immunol **9**:1215-1223.
- Kaminski, S., N. Hermann-Kleiter, M. Meisel, N. Thuille, S. Cronin, H. Hara, F. Fresser, J.M. Penninger, & G. Baier. 2011. *Coronin 1A is an essential regulator of the TGFbeta receptor/SMAD3 signaling pathway in Th17 CD4(+) T cells*. J Autoimmun **37**:198-208.
- Kanehisa, M., S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi, & M. Tanabe. 2012. *KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets*. Nucleic Acids Res **40**:D109-114.
- Kang, H.K., M.A. Michaels, B.R. Berner, & S.K. Datta. 2005. *Very low-dose tolerance with nucleosomal peptides controls lupus and induces potent regulatory T cell subsets*. J Immunol **174**:3247-3255.
- Kang, H.K., M. Liu, & S.K. Datta. 2007. *Low-dose peptide tolerance therapy of lupus generates plasmacytoid dendritic cells that cause expansion of autoantigen-specific regulatory T cells and contraction of inflammatory Th17 cells*. J Immunol **178**:7849-7858.
- Kang, J., S.J. Huddleston, J.M. Fraser, & A. Khoruts. 2008. *De novo induction of antigen-specific CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in vivo following systemic antigen administration accompanied by blockade of mTOR*. J Leukoc Biol **83**:1230-1239.
- Kang, H.K., M.Y. Chiang, M. Liu, D. Ecklund, & S.K. Datta. 2011. *The histone peptide H4 71-94 alone is more effective than a cocktail of peptide epitopes in controlling lupus: immunoregulatory mechanisms*. J Clin Immunol **31**:379-394.
- Kang, J., S.Y. Lee, Y.J. Kim, J.Y. Park, S.J. Kwon, M.J. Na, E.J. Lee, H.S. Jeon, & J.W. Son. 2012. *microRNA-99b acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by directly targeting fibroblast growth factor receptor 3*. Exp Ther Med **3**:149-153.
- Kano, T., M. Sakai, & M. Muramatsu. 1987. *Structure and expression of a human class pi glutathione S-transferase messenger RNA*. Cancer Res **47**:5626-5630.
- Karamloo, F., A. Wangorsch, H. Kasahara, L.B. Davin, D. Haustein, N.G. Lewis, & S. Vieths. 2001. *Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables*. Eur J Biochem **268**:5310-5320.
- Karki, S., & E.L. Holzbaur. 1999. *Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport*. Curr Opin Cell Biol **11**:45-53.
- Karlsson, M., S. Lundin, U. Dahlgren, H. Kahu, I. Pettersson, & E. Telemo. 2001. *"Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells*. Eur J Immunol **31**:2892-2900.
- Karlsson, M.R., Johansen, F.E., Kahu, H., A. Macpherson, & P. Brandtzaeg. 2010. *Hypersensitivity and oral tolerance in the absence of a secretory immune system*. Allergy **65**:561-570.
- Kato, M., S. Putta, M. Wang, H. Yuan, L. Lanting, I. Nair, A. Gunn, Y. Nakagawa, H. Shimano, I. Todorov, J.J. Rossi, & R. Natarajan. 2009. *TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN*. Nat Cell Biol **11**:881-889.
- Katoh, M., & M. Katoh. 2004. **Identification and characterization of human MPP7 gene and mouse Mpp7 gene in silico**. International journal of molecular medicine **13**:333-338.
- Kawano, Y., T. Noma, & J. Yata. 1994. *Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2*. J Immunol **153**:4948-4958.
- Kawasaki, H., & S. Iwamuro. 2008. *Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents*. Infect Disord Drug Targets **8**:195-205.

- Kay, A. 2008. *Allergy and Allergic Diseases*. Oxford. Ed Blackwell Science.
- Kazarian, S.G., & K.L. Chan. 2013. ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. *Analyst* (in press).
- Keller, S., M.P. Sanderson, A. Stoeck, & P. Altevogt. 2006. *Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function*. *Immunol Lett* **107**:102-108.
- Keller, S., C. Rupp, A. Stoeck, S. Runz, M. Fogel, S. Lugert, H.D. Hager, M.S. Abdel-Bakky, P. Gutwein, & P. Altevogt. 2007. *CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid*. *Kidney Int* **72**:1095-1102.
- Keller, S., A.K. Konig, F. Marme, S. Runz, S. Wolterink, D. Koensgen, A. Mustea, J. Sehouli, & P. Altevogt. 2009. *Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes*. *Cancer Lett* **278**:73-81.
- Kennedy, K.J., W.S. Smith, S.D. Miller, & W.J. Karpus. 1997. *Induction of antigen-specific tolerance for the treatment of ongoing, relapsing autoimmune encephalomyelitis: a comparison between oral and peripheral tolerance*. *J Immunol* **159**:1036-1044.
- Kesimer, M., M. Scull, B. Brighton, G. DeMaria, K. Burns, W. O'Neal, R.J. Pickles, & J.K. Sheehan. 2009. *Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense*. *FASEB J* **23**:1858-1868.
- Kienzl-Wagner, K., J. Pratschke, & G. Brandacher. 2012. *Biomarker discovery in transplantation-proteomic adventure or mission impossible?* *Clin Biochem*
- Kim, J.W., E. Wieckowski, D.D. Taylor, T.E. Reichert, S. Watkins, & T.L. Whiteside. 2005a. *Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes*. *Clin Cancer Res* **11**:1010-1020.
- Kim, S.H., E.R. Lechman, N. Bianco, R. Menon, A. Keravala, J. Nash, Z. Mi, S.C. Watkins, A. Gambotto, & P.D. Robbins. 2005b. *Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis*. *J Immunol* **174**:6440-6448.
- Kim, S.H., N. Bianco, R. Menon, E.R. Lechman, W.J. Shufesky, A.E. Morelli, & P.D. Robbins. 2006. *Exosomes derived from genetically modified DC expressing FasL are anti-inflammatory and immunosuppressive*. *Mol Ther* **13**:289-300.
- Kim, S.H., N.R. Bianco, W.J. Shufesky, A.E. Morelli, & P.D. Robbins. 2007. *Effective treatment of inflammatory disease models with exosomes derived from dendritic cells genetically modified to express IL-4*. *J Immunol* **179**:2242-2249.
- Kim, S.G., S.T. Kim, Y. Wang, S.K. Kim, C.H. Lee, K.K. Kim, J.K. Kim, S.Y. Lee, & K.Y. Kang. 2010. *Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (OsIRL) confers tolerance to reactive oxygen species*. *Physiol Plant* **138**:1-9.
- King, T.P., D. Hoffman, H. Lowenstein, D.G. Marsh, T.A. Platts-Mills, & W. Thomas. 1994. *Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee*. *Int Arch Allergy Immunol* **105**:224-233.
- King, T.P., S.Y. Jim, R.I. Monsalve, A. Kagey-Sobotka, L.M. Lichtenstein, & M.D. Spangfort. 2001. *Recombinant allergens with reduced allergenicity but retaining immunogenicity of the natural allergens: hybrids of yellow jacket and paper wasp venom allergen antigen 5s*. *J Immunol* **166**:6057-6065.
- King, N.E., N. Zimmermann, S.M. Pope, P.C. Fulkerson, N.M. Nikolaidis, A. Mishra, D.P. Witte, & M.E. Rothenberg. 2004. *Expression and regulation of a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) 8 in experimental asthma*. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**:257-265.

- Kiyono, H., & S. Fukuyama. 2004. *NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity*. Nat Rev Immunol **4**:699-710.
- Klibi, J., T. Niki, A. Riedel, C. Pioche-Durieu, S. Souquere, E. Rubinstein, S. Le Moulec, J. Guigay, M. Hirashima, F. Guemira, D. Adhikary, J. Mautner, & P. Busson. 2009. *Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells*. Blood **113**:1957-1966.
- Klimek, L., Bachert, C., Doemer, C., H. Meyer, & A. Narkus. 2005. *Specific immunotherapy with recombinant birch pollen allergen rBet v 1-FV is clinically efficacious*. Allergy Clin Immunol Int **15 Suppl 1**.
- Klug, J., H.M. Beier, A. Bernard, B.S. Chilton, T.P. Fleming, R.I. Lehrer, L. Miele, N. Pattabiraman, & G. Singh. 2000. *Uteroglobin/Clara cell 10-kDa family of proteins: nomenclature committee report*. Ann N Y Acad Sci **923**:348-354.
- Koletzko, S., & B. Koletzko. 2009. *Allergen avoidance approaches in food allergy management*. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program **64**:169-180; discussion 180-164, 251-167.
- Kozomara, A., & S. Griffiths-Jones. 2011. *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res **39**:D152-157.
- Krämer-Albers, E.M., N. Bretz, S. Tenzer, C. Winterstein, W. Mobius, H. Berger, K.A. Nave, H. Schild, & J. Trotter. 2007. *Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons?* Proteomics Clin Appl **1**:1446-1461.
- Kravets, F.G., J. Lee, B. Singh, A. Trocchia, S.N. Pentiyala, & S.A. Khan. 2000. *Prostasomes: current concepts*. Prostate **43**:169-174.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., M. Stoffel, & N. Rjewsky. 2005. *Combinatorial microRNA target predictions*. Nat Genet **37**(5):495-500.
- Kroeger, J.H., A. Geitmann, & M. Grant. 2008. *Model for calcium dependent oscillatory growth in pollen tubes*. J Theor Biol **253**:363-374.
- Krol, J., V. Busskamp, I. Markiewicz, M.B. Stadler, S. Ribi, J. Richter, J. Duebel, S. Bicker, H.J. Fehling, D. Schubeler, T.G. Oertner, G. Schratt, M. Bibel, B. Roska, & W. Filipowicz. 2010. *Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs*. Cell **141**:618-631.
- Ku, N.O., & M.B. Omary. 2006. *A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8*. J Cell Biol **174**:115-125.
- Kundig, T.M., G. Senti, G. Schnetzler, C. Wolf, B.M. Prinz Vavricka, A. Fulurija, F. Hennecke, K. Sladko, G.T. Jennings, & M.F. Bachmann. 2006. *Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults*. J Allergy Clin Immunol **117**:1470-1476.
- Kusano, Y., Mortensen, H., Stenum, B., Rozlosnik, N., Strange, M., Kingshott, P., Goutianos, S., B.F. Sorensen, & H. Bindslev. 2006. *Adhesion improvement of glassy carbon plates by atmospheric pressure plasma*. Presented at 27th Congr., Riso International Symposium on Materials Science, Denmark.
- Kwon, C., P. Bednarek, & P. Schulze-Lefert. 2008. *Secretory pathways in plant immune responses*. Plant Physiol **147**:1575-1583.
- Laemmli, U.K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227**:680-685.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, & T. Tuschl. 2001. *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science **294**:853-858.

- Lai, R.C., F. Arslan, M.M. Lee, N.S. Sze, A. Choo, T.S. Chen, M. Salto-Tellez, L. Timmers, C.N. Lee, R.M. El Oakley, G. Pasterkamp, D.P. de Kleijn, & S.K. Lim. 2010. *Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Stem Cell Res* **4**:214-222.
- Lam, S.K., Y.C. Tse, D.G. Robinson, & L. Jiang. 2007. *Tracking down the elusive early endosome*. *Trends Plant Sci* **12**:497-505.
- Lambrecht, B.N., & H. Hammad. 2012. *Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology*. *Annu Rev Immunol* **30**:243-270.
- Lamparski, H.G., A. Metha-Damani, J.Y. Yao, S. Patel, D.H. Hsu, C. Ruegg, & J.B. Le Pecq. 2002. *Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells*. *J Immunol Methods* **270**:211-226.
- Larangeira, A.P., A.R. Silva, R.N. Gomes, C. Penido, M.G. Henriques, H.C. Castro-Faria-Neto, & P.T. Bozza. 2001. *Mechanisms of allergen- and LPS-induced bone marrow eosinophil mobilization and eosinophil accumulation into the pleural cavity: a role for CD11b/CD18 complex*. *Inflamm Res* **50**:309-316.
- Larche, M., C.A. Akdis, & R. Valenta. 2006. *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. *Nat Rev Immunol* **6**:761-771.
- Lasch, P., L. Chiriboga, H. Yee, & M. Diem. 2002. *Infrared spectroscopy of human cells and tissue: detection of disease*. *Technol Cancer Res Treat* **1**:1-7.
- Lass, A., R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J.G. Strauss, G. Gorkiewicz, & R. Zechner. 2006. *Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome*. *Cell Metab* **3**:309-319.
- Lässer, C., M. Eldh, & J. Lotvall. 2012. *Isolation and characterization of RNA-containing exosomes*. *J Vis Exp* e3037.
- Lau, N.C., L.P. Lim, E.G. Weinstein, & D.P. Bartel. 2001. *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans**. *Science* **294**:858-862.
- Laulagnier, K., C. Motta, S. Hamdi, S. Roy, F. Fauvelle, J.F. Pageaux, T. Kobayashi, J.P. Salles, B. Perret, C. Bonnerot, & M. Record. 2004. *Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization*. *Biochem J* **380**:161-171.
- Lauzurica, P., C. Gurbindo, N. Maruri, B. Galocha, R. Díaz, J. González, R. García, & C. Lahoz. 1988. *Olive (*Olea europea*) pollen allergens-I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody*. *Mol Immunol* **25**:329-335.
- Layton, L., R. Panzani, & L.T. von Helms. 1970. *Cross-reactivity in primary respiratory allergy to castorbean (*Ricinus communis*)*. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **37**:67-75.
- Le Pecq, J.B. 2005. *Dexosomes as a therapeutic cancer vaccine: from bench to bedside*. *Blood Cells Mol Dis* **35**:129-135.
- Ledesma, A., R. Rodríguez, & M. Villalba. 1998a. *Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties*. *Allergy* **53**:520-526.
- Ledesma, A., M. Villalba, E. Batanero, & R. Rodríguez. 1998b. *Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy*. *Eur J Biochem* **258**:454-459.
- Ledesma, A., M. Villalba, & R. Rodríguez. 2000. *Cloning, expression and characterization of a novel four EF-hand Ca(2+)-binding protein from olive pollen with allergenic activity*. *FEBS Lett* **466**:192-196.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, & V. Ambros. 1993. *The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14**. *Cell* **75**:843-854.

- Lee, R.C., & V. Ambros. 2001. *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science **294**:862-864.
- Lee, Y.C., K.H. Lee, H.B. Lee, & Y.K. Rhee. 2001. *Serum levels of interleukins (IL)-4, IL-5, IL-13, and interferon-gamma in acute asthma*. J Asthma **38**:665-671.
- Lees-Miller, J.P., D.M. Helfman, & T.A. Schroer. 1992. *A vertebrate actin-related protein is a component of a multisubunit complex involved in microtubule-based vesicle motility*. Nature **359**:244-246.
- Lei, H.Y., S.H. Lee, & S.H. Leir. 1996. *Antigen-induced anaphylactic death in mice*. Int Arch Allergy Immunol **109**:407-412.
- Leiferman, K.M., & G.J. Gleich. 1976. *The cross-reactivity of IgE antibodies with pollen allergens. I. Analyses of various species of grass pollens*. J Allergy Clin Immunol **58**:129-139.
- Leinders-Zufall, T., T. Ishii, P. Mombaerts, F. Zufall, & T. Boehm. 2009. *Structural requirements for the activation of vomeronasal sensory neurons by MHC peptides*. Nat Neurosci **12**:1551-1558.
- Lenassi, M., G. Cagney, M. Liao, T. Vaupotic, K. Bartholomeeusen, Y. Cheng, N.J. Krogan, A. Plemenitas, & B.M. Peterlin. 2010. *HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells*. Traffic **11**:110-122.
- Lewis, B.P., C.B. Burge, & D.P. Bartel. 2005. *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell **120**:15-20.
- Lewis, P.D., K.E. Lewis, R. Ghosal, S. Bayliss, A.J. Lloyd, J. Wills, R. Godfrey, P. Kloer, & L.A. Mur. 2010. *Evaluation of FTIR spectroscopy as a diagnostic tool for lung cancer using sputum*. BMC Cancer **10**:640.
- Li, L., Y. Xia, A. Nguyen, Y.H. Lai, L. Feng, T.R. Mosmann, & D. Lo. 1999. *Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells*. J Immunol **162**:2477-2487.
- Li, Y.Q., A. Mareck, C. Faleri, A. Moscatelli, Q. Liu, & M. Cresti. 2002. *Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of Nicotiana tabacum L.* Planta **214**:734-740.
- Li, W., H. Li, H. Wu, & X.Y. Chen. 2010. *Use of chromosome walking in discovery of single-nucleotide polymorphism in noncoding regions of a candidate actin gene in Pinus radiata*. J Appl Genet **51**:275-281.
- Liao, L., D. Cheng, J. Wang, D.M. Duong, T.G. Losik, M. Gearing, H.D. Rees, J.J. Lah, A.I. Levey, & J. Peng. 2004. *Proteomic characterization of postmortem amyloid plaques isolated by laser capture microdissection*. J Biol Chem **279**:37061-37068.
- Liccardi, G., M. D'Amato, & G. D'Amato. 1996. *Oleaceae pollinosis: a review*. Int Arch Allergy Immunol **111**:210-217.
- Lievens, J.C., M. Iche, M. Laval, C. Faivre-Sarrailh, & S. Birman. 2008. *AKT-sensitive or insensitive pathways of toxicity in glial cells and neurons in Drosophila models of Huntington's disease*. Hum Mol Genet **17**:882-894.
- Ling, H.Y., H.S. Ou, S.D. Feng, X.Y. Zhang, Q.H. Tuo, L.X. Chen, B.Y. Zhu, Z.P. Gao, C.K. Tang, W.D. Yin, L. Zhang, & D.F. Liao. 2009. *CHANGES IN microRNA (miR) profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes*. Clin Exp Pharmacol Physiol **36**:e32-39.
- Linhart, B., A. Hartl, B. Jahn-Schmid, P. Verdino, W. Keller, M.T. Krauth, P. Valent, F. Horak, U. Wiedermann, J. Thalhamer, C. Ebner, D. Kraft, & R. Valenta. 2005. *A hybrid molecule resembling the epitope spectrum of grass pollen for allergy vaccination*. J Allergy Clin Immunol **115**:1010-1016.

- Linhart, B., N. Mothes-Luksch, S. Vrtala, M. Kneidinger, P. Valent, & R. Valenta. 2008. *A hypoallergenic hybrid molecule with increased immunogenicity consisting of derivatives of the major grass pollen allergens, Phl p 2 and Phl p 6*. *Biol Chem* **389**:925-933.
- Liu, C., S. Yu, K. Zinn, J. Wang, L. Zhang, Y. Jia, J.C. Kappes, S. Barnes, R.P. Kimberly, W.E. Grizzle, & H.G. Zhang. 2006. *Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function*. *J Immunol* **176**:1375-1385.
- Liu, Y., X. Xiang, X. Zhuang, S. Zhang, C. Liu, Z. Cheng, S. Michalek, W. Grizzle, & H.G. Zhang. 2010. *Contribution of MyD88 to the tumor exosome-mediated induction of myeloid derived suppressor cells*. *Am J Pathol* **176**:2490-2499.
- Lo, S.H. 2006. *Focal adhesions: what's new inside*. *Dev Biol* **294**:280-291.
- Lo, B., S. Hansen, K. Evans, J.K. Heath, & J.R. Wright. 2008. *Alveolar epithelial type II cells induce T cell tolerance to specific antigen*. *J Immunol* **180**:881-888.
- Loconto, J., F. Papes, E. Chang, L. Stowers, E.P. Jones, T. Takada, A. Kumanovics, K. Fischer Lindahl, & C. Dulac. 2003. *Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules*. *Cell* **112**:607-618.
- Lombardero, M., S. Quirce, O. Duffort, D. Barber, J. Carpizo, M.J. Chamorro, A. Lezaun, & J. Carreira. 1992. *Monoclonal antibodies against Olea europaea major allergen: allergenic activity of affinity-purified allergen and depleted extract and development of a radioimmunoassay for the quantitation of the allergen*. *J Allergy Clin Immunol* **89**:884-894.
- Lombardero, M., J.A. Barbas, J. Moscoso del Prado, & J. Carreira. 1994. *cDNA sequence analysis of the main olive allergen, Ole e 1*. *Clin Exp Allergy* **24**:765-770.
- Lombardero, M., T. Obispo, B. Calabozo, A. Lezaun, F. Polo, & D. Barber. 2002. *Cross-reactivity between olive and other species. Role of Ole e 1-related proteins*. *Allergy* **57 Suppl 71**:29-34.
- Lombardi, C., C. Incorvaia, M. Braga, G. Senna, G.W. Canonica, & G. Passalacqua. 2009. *Administration regimens for sublingual immunotherapy to pollen allergens: what do we know?* *Allergy* **64**:849-854.
- Loomis, R.J., D.A. Holmes, A. Elms, P.A. Solski, C.J. Der, & L. Su. 2006. *Citron kinase, a RhoA effector, enhances HIV-1 virion production by modulating exocytosis*. *Traffic* **7**:1643-1653.
- Looze, C., D. Yui, L. Leung, M. Ingham, M. Kaler, X. Yao, W.W. Wu, R.F. Shen, M.P. Daniels, & S.J. Levine. 2009. *Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein*. *Biochem Biophys Res Commun* **378**:433-438.
- Lou, D.Q., G. Nicolas, J.C. Lesbordes, L. Viatte, G. Grimber, M.F. Szajnert, A. Kahn, & S. Vaulont. 2004. *Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice*. *Blood* **103**:2816-2821.
- Louafi, F., R.T. Martínez-Nunez, & T. Sánchez-Elsner. 2010. *MicroRNA-155 targets SMAD2 and modulates the response of macrophages to transforming growth factor- β* . *J Biol Chem* **285**:41328-41336.
- Loveless, M.H. 1940. *Immunological studies of pollinosis. I. The presence of two antibodies related to the same pollen antigen in the serum of treated hay-fever patients*. *J Immunol* **38**:25-50.
- Lowrey, J.L., N.D. Savage, D. Palliser, M. Corsin-Jimenez, L.M. Forsyth, G. Hall, S. Lindey, G.A. Stewart, K.A. Tan, G.F. Hoyne, & J.R. Lamb. 1998. *Induction of tolerance via the respiratory mucosa*. *Int Arch Allergy Immunol* **116**:93-102.
- Lu, T.X., A. Munitz, & M.E. Rothenberg. 2009. *MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression*. *J Immunol* **182**:4994-5002.

- Lu, T.X., E.J. Lim, T. Wen, A.J. Plassard, S.P. Hogan, L.J. Martin, B.J. Aronow, & M.E. Rothenberg. 2012. *MiR-375 is downregulated in epithelial cells after IL-13 stimulation and regulates an IL-13-induced epithelial transcriptome*. *Mucosal Immunol* **5**:388-396.
- Luster, A.D., R. Alon, & U.H. von Andrian. 2005. *Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets*. *Nat Immunol* **6**:1182-1190.
- Macaubas, C., R.H. DeKruyff, & D.T. Umetsu. 2003. *Respiratory tolerance in the protection against asthma*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2**:175-186.
- Madan, T., U. Kishore, M. Singh, P. Strong, H. Clark, E.M. Hussain, K.B. Reid, & P.U. Sarma. 2001. *Surfactant proteins A and D protect mice against pulmonary hypersensitivity induced by Aspergillus fumigatus antigens and allergens*. *J Clin Invest* **107**:467-475.
- Madan, T., K.B. Reid, M. Singh, P.U. Sarma, & U. Kishore. 2005. *Susceptibility of mice genetically deficient in the surfactant protein (SP)-A or SP-D gene to pulmonary hypersensitivity induced by antigens and allergens of Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* **174**:6943-6954.
- Mahler, V., S. Fischer, S. Heiss, M. Duchene, D. Kraft, & R. Valenta. 2001. *cDNA cloning and characterization of a cross-reactive birch pollen allergen: identification as a pectin esterase*. *Int Arch Allergy Immunol* **124**:64-66.
- Malhotra, R., J. Haurum, S. Thiel, J.C. Jensenius, & R.B. Sim. 1993. *Pollen grains bind to lung alveolar type II cells (A549) via lung surfactant protein A (SP-A)*. *Biosci Rep* **13**:79-90.
- Malley, A., & F. Perlman. 1969. *Induction of both reaginic and blocking antibodies with a low molecular weight fraction of timothy pollen extract*. *J Allergy* **43**:59-64.
- Mandal, A.K., Z. Zhang, R. Ray, M.S. Choi, B. Chowdhury, N. Pattabiraman, & A.B. Mukherjee. 2004. *Uteroglobin represses allergen-induced inflammatory response by blocking PGD2 receptor-mediated functions*. *J Exp Med* **199**:1317-1330.
- Mannervik, B., P. Alin, C. Guthenberg, H. Jensson, M.K. Tahir, M. Warholm, & H. Jornvall. 1985. *Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:7202-7206.
- Mantel, P.Y., & C.B. Schmidt-Weber. 2011. *Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance*. *Methods Mol Biol* **677**:303-338.
- Marazuela, E.G., R. Rodríguez, D. Barber, M. Villalba, & E. Batanero. 2007. *Hypoallergenic mutants of Ole e 1, the major olive pollen allergen, as candidates for allergy vaccines*. *Clin Exp Allergy* **37**:251-260.
- Marazuela, E.G., N. Prado, E. Moro, H. Fernández-García, M. Villalba, R. Rodríguez, & E. Batanero. 2008a. *Intranasal vaccination with poly(lactide-co-glycolide) microparticles containing a peptide T of Ole e 1 prevents mice against sensitization*. *Clin Exp Allergy* **38**:520-528.
- Marazuela, E.G., R. Rodríguez, H. Fernández-García, M.S. García, M. Villalba, & E. Batanero. 2008b. *Intranasal immunization with a dominant T-cell epitope peptide of a major allergen of olive pollen prevents mice from sensitization to the whole allergen*. *Mol Immunol* **45**:438-445.
- Marazuela, E.G., R. Hajek, M. Villalba, D. Barber, H. Breiteneder, R. Rodríguez, & E. Batanero. 2012. *A non-allergenic Ole e 1-like protein from birch pollen as a tool to design hypoallergenic vaccine candidates*. *Mol Immunol* **50**:83-90.
- Marknell DeWitt, A., V. Niederberger, P. Lehtonen, S. Spitzauer, W.R. Sperr, P. Valent, R. Valenta, & J. Lidholm. 2002. *Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen, Phl p 11*. *Clin Exp Allergy* **32**:1329-1340.

- Marsh, D.G., L.M. Lichtenstein, & D.H. Campbell. 1970. *Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I. Assay of allergenicity and antigenicity of formalinized rye group I component*. Immunology **18**:705-722.
- Marth, T., Z. Zeitz, B. Ludviksson, W. Strober, & B. Kelsall. 1998. *Murine model of oral tolerance. Induction of Fas-mediated apoptosis by blockade of interleukin-12*. Ann N Y Acad Sci **859**:290-294.
- Martin-Orozco, E., B. Cárdbaba, V. del Pozo, B. de Andrés, M. Villalba, S. Gallardo, M.I. Rodríguez-García, M.C. Fernández, J.D. Alché, & R. Rodríguez. 1994. *Ole e I: epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization*. Int Arch Allergy Immunol **104**:160-170.
- Marzesco, A.M., P. Janich, M. Wilsch-Brauninger, V. Dubreuil, K. Langenfeld, D. Corbeil, & W.B. Huttner. 2005. *Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells*. J Cell Sci **118**:2849-2858.
- Mascarell, L., A. Zimmer, L. Van Overtvelt, S. Tourdot, & P. Moingeon. 2011. *Induction of allergen-specific tolerance via mucosal routes*. Curr Top Microbiol Immunol **352**:85-105.
- Masuda, K. 2005. *DNA vaccination against Japanese cedar pollinosis in dogs suppresses type I hypersensitivity by controlling lesional mast cells*. Vet Immunol Immunopathol **108**:185-187.
- Mathivanan, S., & R.J. Simpson. 2009. *ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA*. Proteomics **9**:4997-5000.
- Mathivanan, S., H. Ji, & R.J. Simpson. 2010. *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. J Proteomics **73**:1907-1920.
- Mathivanan, S., C.J. Fahner, G.E. Reid, & R.J. Simpson. 2012. *ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids*. Nucleic Acids Res **40**:D1241-1244.
- Matsuno, O., T. Kumamoto, & Y. Higuchi. 2008. *ADAM8 in allergy*. Inflamm Allergy Drug Targets **7**:108-112.
- Mattila, P., J. Renkonen, S. Toppila-Salmi, V. Parviainen, S. Joenvaara, S. Alff-Tuomala, D. Nicorici, & R. Renkonen. 2010. *Time-series nasal epithelial transcriptomics during natural pollen exposure in healthy subjects and allergic patients*. Allergy **65**:175-183.
- Mattila, P., S. Joenvaara, J. Renkonen, S. Toppila-Salmi, & R. Renkonen. 2011. *Allergy as an epithelial barrier disease*. Clin Transl Allergy **1**:5.
- McMenamin, C., & P.G. Holt. 1993. *The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production*. J Exp Med **178**:889-899.
- McMenamin, C., C. Pimm, M. McKersey, & P.G. Holt. 1994. *Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells*. Science **265**:1869-1871.
- Mehrotra, R., G. Tyagi, D.K. Jangir, R. Dawar, & N. Gupta. 2010. *Analysis of ovarian tumor pathology by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. J Ovarian Res **3**:27.
- Melamed, D., & A. Friedman. 1993. *Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin*. Eur J Immunol **23**:935-942.
- Melamed, D., J. Fishman-Lovell, Z. Uni, H.L. Weiner, & A. Friedman. 1996. *Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin*. Int Immunol **8**:717-724.
- Meyer, D., S. Pajonk, C. Micali, R. O'Connell, & P. Schulze-Lefert. 2009. *Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments*. Plant J **57**:986-999.

- Micali, C.O., U. Neumann, D. Grunewald, R. Panstruga, & R. O'Connell. 2011. *Biogenesis of a specialized plant-fungal interface during host cell internalization of Golovinomyces orontii haustoria*. Cell Microbiol **13**:210-226.
- Michaloski, J.S., P.A. Galante, M.H. Nagai, L. Armelin-Correa, M.S. Chien, H. Matsunami, & B. Malnic. 2011. *Common promoter elements in odorant and vomeronasal receptor genes*. PLoS One **6**:e29065.
- Micheli, F. 2001. *Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology*. Trends Plant Sci **6**:414-419.
- Mimeault, M., & S.K. Batra. 2007. *Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies*. Ann Oncol **18**:1605-1619.
- Min, T., H. Kasahara, D.L. Bedgar, B. Youn, P.K. Lawrence, D.R. Gang, S.C. Halls, H. Park, J.L. Hilsenbeck, L.B. Davin, N.G. Lewis, & C. Kang. 2003. *Crystal structures of pinoresinol-lariciresinol and phenylcoumaran benzylic ether reductases and their relationship to isoflavone reductases*. J Biol Chem **278**:50714-50723.
- Mitchell, P., E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann, & D. Tollervey. 1997. *The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases*. Cell **91**:457-466.
- Mitchell, J.P., J. Court, M.D. Mason, Z. Tabi, & A. Clayton. 2008. *Increased exosome production from tumour cell cultures using the Integra CELLine Culture System*. J Immunol Methods **335**:98-105.
- Mitchell, P.J., J. Welton, J. Staffurth, J. Court, M.D. Mason, Z. Tabi, & A. Clayton. 2009. *Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer?* J Transl Med **7**:4.
- Mittag, D., J. Akkerdaas, B.K. Ballmer-Weber, L. Vogel, M. Wensing, W.M. Becker, S.J. Koppelman, A.C. Knulst, A. Helbling, S.L. Hefle, R. Van Ree, & S. Vieths. 2004. *Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy*. J Allergy Clin Immunol **114**:1410-1417.
- Mittelbrunn, M., C. Gutierrez-Vazquez, C. Villarroja-Beltri, S. González, F. Sánchez-Cabo, M.A. González, A. Bernad, & F. Sánchez-Madrid. 2011. *Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells*. Nat Commun **2**:282.
- Miyahara, S. 1995. *[Olive pollinosis in Japan]*. Arerugi **44**:1305-1310.
- Mochizuki, M., J. Bartels, A.I. Mallet, E. Christophers, & J.M. Schroder. 1998. *IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy*. J Immunol **160**:60-68.
- Mogensen, J.E., M. Ferreras, R. Wimmer, S.V. Petersen, J.J. Enghild, & D.E. Otzen. 2007. *The major allergen from birch tree pollen, Bet v 1, binds and permeabilizes membranes*. Biochemistry **46**:3356-3365.
- Mombaerts, P. 1999. *Odorant receptor genes in humans*. Curr Opin Genet Dev **9**:315-320.
- Monn, C., & H.S. Koren. 1999. *Bioaerosols in ambient air particulates: a review and research needs*. Rev Environ Health **14**:79-89.
- Morelli, A.E., A.T. Larregina, W.J. Shufesky, M.L. Sullivan, D.B. Stolz, G.D. Papworth, A.F. Zahorchak, A.J. Logar, Z. Wang, S.C. Watkins, L.D. Falo, Jr., & A.W. Thomson. 2004. *Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells*. Blood **104**:3257-3266.
- Morgan, S., & J.R. Grandis. 2009. *ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract*. Exp Cell Res **315**:572-582.

- Morokata, T., J. Ishikawa, K. Ida, & T. Yamada. 1999. *C57BL/6 mice are more susceptible to antigen-induced pulmonary eosinophilia than BALB/c mice, irrespective of systemic T helper 1/T helper 2 responses*. Immunology **98**:345-351.
- Morris, S.C., T. Orekhova, M.J. Meadows, S.M. Heidorn, J. Yang, & F.D. Finkelman. 2006. *IL-4 induces in vivo production of IFN-gamma by NK and NKT cells*. J Immunol **176**:5299-5305.
- Morse, M.A., J. Garst, T. Osada, S. Khan, A. Hobeika, T.M. Clay, N. Valente, R. Shreeniwas, M.A. Sutton, A. Delcayre, D.H. Hsu, J.B. Le Pecq, & H.K. Lyerly. 2005. *A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer*. J Transl Med **3**:9.
- Moscatelli, A., F. Ciampolini, S. Rodighiero, E. Onelli, M. Cresti, N. Santo, & A. Idilli. 2007. *Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold*. J Cell Sci **120**:3804-3819.
- Moscatelli, A., & A.I. Idilli. 2009. *Pollen tube growth: a delicate equilibrium between secretory and endocytic pathways*. J Integr Plant Biol **51**:727-739.
- Mosmann, T.R., & R.L. Coffman. 1989. *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol **7**:145-173.
- Mothes, N., F. Horak, & R. Valenta. 2004. *Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy*. Int Arch Allergy Immunol **135**:357-373.
- Mould, A.W., K.I. Matthaei, I.G. Young, & P.S. Foster. 1997. *Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice*. J Clin Invest **99**:1064-1071.
- Mountford, A.P., A. Fisher, & R.A. Wilson. 1994. *The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol **16**:521-527.
- Moverare, R., K. Westritschnig, M. Svensson, B. Hayek, M. Bende, G. Pauli, R. Sorva, T. Haahtela, R. Valenta, & L. Elfman. 2002. *Different IgE reactivity profiles in birch pollen-sensitive patients from six European populations revealed by recombinant allergens: an imprint of local sensitization*. Int Arch Allergy Immunol **128**:325-335.
- Mueller, P., J. Massner, R. Jayachandran, B. Combaluzier, I. Albrecht, J. Gatfield, C. Blum, R. Ceredig, H.R. Rodewald, A.G. Rolink, & J. Pieters. 2008. *Regulation of T cell survival through coronin-1-mediated generation of inositol-1,4,5-trisphosphate and calcium mobilization after T cell receptor triggering*. Nat Immunol **9**:424-431.
- Muff, R., R.M. Ram Kumar, S.M. Botter, W. Born, & B. Fuchs. 2012. *Genes regulated in metastatic osteosarcoma: evaluation by microarray analysis in four human and two mouse cell line systems*. Sarcoma **2012**:937506.
- Muindi, K., M. Cernadas, G.F. Watts, L. Royle, D.C. Neville, R.A. Dwek, G.S. Besra, P.M. Rudd, T.D. Butters, & M.B. Brenner. 2010. *Activation state and intracellular trafficking contribute to the repertoire of endogenous glycosphingolipids presented by CD1d [corrected]*. Proc Natl Acad Sci U S A **107**:3052-3057.
- Mukherjee, A.B., G.C. Kundu, G. Mantile-Selvaggi, C.J. Yuan, A.K. Mandal, S. Chattopadhyay, F. Zheng, N. Pattabiraman, & Z. Zhang. 1999. *Uteroglobin: a novel cytokine?* Cell Mol Life Sci **55**:771-787.
- Müller, U., C.A. Akdis, M. Fricker, M. Akdis, T. Blesken, F. Bettens, & K. Blaser. 1998. *Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom*. J Allergy Clin Immunol **101**:747-754.
- Mullock, B.M., N.A. Bright, C.W. Fearon, S.R. Gray, & J.P. Luzio. 1998. *Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent*. J Cell Biol **140**:591-601.
- Munitz, A., M.L. McBride, J.S. Bernstein, & M.E. Rothenberg. 2008. *A dual activation and inhibition role for the paired immunoglobulin-like receptor B in eosinophils*. Blood **111**:5694-5703.

- Murk, J.L., W. Stoorvogel, M.J. Kleijmeer, & H.J. Geuze. 2002. *The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation*. *Semin Cell Dev Biol* **13**:303-311.
- Murray, J., B. Zhang, S.W. Taylor, D. Oglesbee, E. Fahy, M.F. Marusich, S.S. Ghosh, & R.A. Capaldi. 2003. *The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification*. *J Biol Chem* **278**:13619-13622.
- Muschiatti, J., L. Dircks, G. Vancanneyt, & S. McCormick. 1994. *LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization*. *Plant J* **6**:321-338.
- Nakamura, K., A. Kitani, & W. Strober. 2001. *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. *J Exp Med* **194**:629-644.
- Napoletano, C., A. Rughetti, R. Landi, D. Pinto, F. Bellati, H. Rahimi, G.P. Spinelli, S. Pauselli, P. Sale, V. Dolo, F. De Lorenzo, F. Tomao, P. Benedetti-Panici, L. Frati, & M. Nuti. 2009. *Immunogenicity of allo-vesicle carrying ERBB2 tumor antigen for dendritic cell-based anti-tumor immunotherapy*. *Int J Immunopathol Pharmacol* **22**:647-658.
- Naumann, D. 2000. *Infrared spectroscopy in microbiology*. *Encyclopedia of analytical chemistry*. United Kingdom. Ed Jhon Wiley & Sons Ltd. 102-131.
- Nayak, A., E. Dodagatta-Marri, A.G. Tsolaki, & U. Kishore. 2012. *An Insight into the Diverse Roles of Surfactant Proteins, SP-A and SP-D in Innate and Adaptive Immunity*. *Front Immunol* **3**:131.
- Nazarenko, I., S. Rana, A. Baumann, J. McAlear, A. Hellwig, M. Trendelenburg, G. Lochnit, K.T. Preissner, & M. Zoller. 2010. *Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation*. *Cancer Res* **70**:1668-1678.
- Nevot, M., V. Deroncelle, P. Messner, J. Guinea, & E. Mercade. 2006. *Characterization of outer membrane vesicles released by the psychrotolerant bacterium Pseudoalteromonas antarctica NF3*. *Environ Microbiol* **8**:1523-1533.
- Newman, S.P. 1985. *Aerosol deposition considerations in inhalation therapy*. *Chest* **88**:152S-160S.
- Nguyen, D.G., A. Booth, S.J. Gould, & J.E. Hildreth. 2003. *Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway*. *J Biol Chem* **278**:52347-52354.
- Nguyen, N.B., K.D. Callaghan, A.J. Ghio, D.J. Haile, & F. Yang. 2006. *Hepcidin expression and iron transport in alveolar macrophages*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**:L417-425.
- Niederberger, V., B. Hayek, S. Vrtala, S. Laffer, A. Twardosz, L. Vangelista, W.R. Sperr, P. Valent, H. Rumpold, D. Kraft, K. Ehrenberger, R. Valenta, & S. Spitzauer. 1999. *Calcium-dependent immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium-bound form of a cross-reactive two EF-hand timothy grass pollen allergen, Phl p 7*. *FASEB J* **13**:843-856.
- Niederberger, V., P. Stubner, S. Spitzauer, D. Kraft, R. Valenta, K. Ehrenberger, & F. Horak. 2001. *Skin test results but not serology reflect immediate type respiratory sensitivity: a study performed with recombinant allergen molecules*. *J Invest Dermatol* **117**:848-851.
- Niederberger, V., F. Horak, S. Vrtala, S. Spitzauer, M.T. Krauth, P. Valent, J. Reisinger, M. Pelzmann, B. Hayek, M. Kronqvist, G. Gafvelin, H. Gronlund, A. Purohit, R. Suck, H. Fiebig, O. Cromwell, G. Pauli, M. van Hage-Hamsten, & R. Valenta. 2004. *Vaccination with genetically engineered allergens prevents progression of allergic disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**:14677-14682.

- Nielsen, M.E., A. Feechan, H. Bohlenius, T. Ueda, & H. Thordal-Christensen. 2012. *Arabidopsis* ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:11443-11448.
- Nilsson, J., J. Skog, A. Nordstrand, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson, X.O. Breakefield, & A. Widmark. 2009. *Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer*. *Br J Cancer* **100**:1603-1607.
- Nograles, K.E., L.C. Zaba, A. Shemer, J. Fuentes-Duculan, I. Cardinale, T. Kikuchi, M. Ramon, R. Bergman, J.G. Krueger, & E. Guttman-Yassky. 2009. *IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells*. *J Allergy Clin Immunol* **123**:1244-1252 e1242.
- Noon, L. 1911. *Prophylactic inoculation against hay fever*. *Lancet* **1**:1572-1573.
- Nolte-'t Hoen, E.N., S.I. Buschow, S.M. Anderton, W. Stoorvogel, & M.H. Wauben. 2009. *Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1*. *Blood* **113**:1977-1981.
- Norman, P.S. 1996. *Clinical experience with treatment of allergies with T cell epitope containing peptides*. *Adv Exp Med Biol* **409**:457-461.
- Norman, P.S., J.L. Ohman, Jr., A.A. Long, P.S. Creticos, M.A. Geftter, Z. Shaked, R.A. Wood, P.A. Eggleston, K.B. Hafner, P. Rao, L.M. Lichtenstein, N.H. Jones, & C.F. Nicodemus. 1996. *Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides*. *Am J Respir Crit Care Med* **154**:1623-1628.
- Norman, P.S. 2004. *Immunotherapy: 1999-2004*. *J Allergy Clin Immunol* **113**:1013-1023; quiz 1024.
- Nosanchuk, J.D., L. Nimrichter, A. Casadevall, & M.L. Rodrigues. 2008. *A role for vesicular transport of macromolecules across cell walls in fungal pathogenesis*. *Commun Integr Biol* **1**:37-39.
- Novak, N., S. Kraft, & T. Bieber. 2001. *IgE receptors*. *Curr Opin Immunol* **13**:721-726.
- Novak, N., T. Bieber, & J.P. Allam. 2011. *Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy*. *Allergy* **66**:733-739.
- Novellino, L., R.L. Rossi, F. Bonino, D. Cavallone, S. Abrignani, M. Pagani, & M.R. Brunetto. 2012. *Circulating hepatitis B surface antigen particles carry hepatocellular microRNAs*. *PLoS One* **7**:e31952.
- O'Brien, T.F., & X.P. Zhong. 2012. *The role and regulation of mTOR in T-lymphocyte function*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **60**:173-181.
- O'Connor, B.P., & J.P. Ting. 2008. *The evolving role of semaphorins and plexins in the immune system: Plexin-A1 regulation of dendritic cell function*. *Immunol Res* **41**:217-222.
- O'Neill, M.A., A.G. Darvill, P. Albersheim, & K.J. Chou. 1990. *Structural analysis of an acidic polysaccharide secreted by Xanthobacter sp. (ATCC 53272)*. *Carbohydr Res* **206**:289-296.
- Odintsova, T.I., E.C. Müller, A.V. Ivanov, T.A. Egorov, R. Bienert, S.N. Vladimirov, S. Kostka, A. Otto, B. Wittmann-Liebold, & G.G. Karpova. 2003. *Characterization and analysis of posttranslational modifications of the human large cytoplasmic ribosomal subunit proteins by mass spectrometry and Edman sequencing*. *J Protein Chem* **22**:249-258.
- Oettgen, H.C., T.R. Martin, A. Wynshaw-Boris, C. Deng, J.M. Drazen, & P. Leder. 1994. *Active anaphylaxis in IgE-deficient mice*. *Nature* **370**:367-370.
- Ogawa, Y., M. Kanai-Azuma, Y. Akimoto, H. Kawakami, & R. Yanoshita. 2008. *Exosome-like vesicles in Gloydius blomhoffii blomhoffii venom*. *Toxicon* **51**:984-993.

- Ogawa, Y., Y. Miura, A. Harazono, M. Kanai-Azuma, Y. Akimoto, H. Kawakami, T. Yamaguchi, T. Toda, T. Endo, M. Tsubuki, & R. Yanoshita. 2011. *Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva*. *Biol Pharm Bull* **34**:13-23.
- Oh, J.W., C.M. Seroogy, E.H. Meyer, O. Akbari, G. Berry, C.G. Fathman, R.H. Dekruyff, & D.T. Umetsu. 2002. *CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation*. *J Allergy Clin Immunol* **110**:460-468.
- Ohshima, K., K. Inoue, A. Fujiwara, K. Hatakeyama, K. Kanto, Y. Watanabe, K. Muramatsu, Y. Fukuda, S. Ogura, K. Yamaguchi, & T. Mochizuki. 2010. *Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line*. *PLoS One* **5**:e13247.
- Oldfield, W.L., A.B. Kay, & M. Larche. 2001. *Allergen-derived T cell peptide-induced late asthmatic reactions precede the induction of antigen-specific hyporesponsiveness in atopic allergic asthmatic subjects*. *J Immunol* **167**:1734-1739.
- Oldfield, W.L., M. Larche, & A.B. Kay. 2002. *Effect of T-cell peptides derived from Fel d 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats: a randomised controlled trial*. *Lancet* **360**:47-53.
- Oliveira, D.L., C.G. Freire-de-Lima, J.D. Nosanchuk, A. Casadevall, M.L. Rodrigues, & L. Nimrichter. 2010. *Extracellular vesicles from Cryptococcus neoformans modulate macrophage functions*. *Infect Immun* **78**:1601-1609.
- Oneyama, C., J. Ikeda, D. Okuzaki, K. Suzuki, T. Kanou, Y. Shintani, E. Morii, M. Okumura, K. Aozasa, & M. Okada. 2011. *MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways*. *Oncogene* **30**:3489-3501.
- Osterlund, C., H. Gronlund, N. Polovic, S. Sundstrom, G. Gafvelin, & A. Bucht. 2009. *The non-proteolytic house dust mite allergen Der p 2 induce NF-kappaB and MAPK dependent activation of bronchial epithelial cells*. *Clin Exp Allergy* **39**:1199-1208.
- Östman, S., M. Taube, & E. Teleme. 2005. *Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent*. *Immunology* **116**:464-476.
- Ostroukhova, M., C. Seguin-Devaux, T.B. Oriss, B. Dixon-McCarthy, L. Yang, B.T. Ameredes, T.E. Corcoran, & A. Ray. 2004. *Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3*. *J Clin Invest* **114**:28-38.
- Ostrowski, M., N.B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C.F. Moita, K. Schauer, A.N. Hume, R.P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M.C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L.F. Moita, & C. Théry. 2010. *Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway*. *Nat Cell Biol* **12**:19-30; sup pp 11-13.
- Ozdemir, C., D. Yazı, I. Gocmen, O. Yesil, M. Aydogan, A. Semic-Jusufagic, N.N. Bahceciler, & I.B. Barlan. 2007. *Efficacy of long-term sublingual immunotherapy as an adjunct to pharmacotherapy in house dust mite-allergic children with asthma*. *Pediatr Allergy Immunol* **18**:508-515.
- Palanisamy, V., S. Sharma, A. Deshpande, H. Zhou, J. Gimzewski, & D.T. Wong. 2010. *Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes*. *PLoS One* **5**:e8577.
- Palomares, O., M. Villalba, J. Quiralte, F. Polo, & R. Rodríguez. 2005. *1,3-beta-glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity*. *Clin Exp Allergy* **35**:345-351.
- Palomares, O., I. Swoboda, M. Villalba, N. Balic, S. Spitzauer, R. Rodríguez, & R. Valenta. 2006. *The major allergen of olive pollen Ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to Oleaceae*. *Int Arch Allergy Immunol* **141**:110-118.
- Pallari, H.M., & J.E. Eriksson. 2006. *Intermediate filaments as signaling platforms*. *Sci STKE* **2006**:pe53.

- Pan, B.T., & R.M. Johnstone. 1983. *Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor*. *Cell* **33**:967-978.
- Pant, S., H. Hilton, & M.E. Burczynski. 2012. *The multifaceted exosome: biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities*. *Biochem Pharmacol* **83**:1484-1494.
- Papadopoulos, G.L., P. Alexiou, M. Maragkakis, M. Reczko, & A.G. Hatzigeorgiou. 2009. *DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways*. *Bioinformatics* **25**:1991-1993.
- Pape, K.A., R. Merica, A. Mondino, A. Khoruts, & M.K. Jenkins. 1998. *Direct evidence that functionally impaired CD4+ T cells persist in vivo following induction of peripheral tolerance*. *J Immunol* **160**:4719-4729.
- Pappas, C.S., P.A. Tarantilis, P.C. Harizanis, & M.G. Polissiou. 2003. *New method for pollen identification by FT-IR spectroscopy*. *Appl Spectrosc* **57**:23-27.
- Parmentier, M., F. Libert, S. Schurmans, S. Schiffmann, A. Lefort, D. Eggerickx, C. Ledent, C. Mollereau, C. Gerard, J. Perret, & et al. 1992. *Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells*. *Nature* **355**:453-455.
- Parolini, I., C. Federici, C. Raggi, L. Lugini, S. Palleschi, A. De Mito, C. Coscia, E. Iessi, M. Logozzi, A. Molinari, M. Colone, M. Tatti, M. Sargiacomo, & S. Fais. 2009. *Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells*. *J Biol Chem* **284**:34211-34222.
- Parseghian, M.H., & K.A. Luhrs. 2006. *Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity*. *Biochem Cell Biol* **84**:589-604.
- Parton, R.M., S. Fischer-Parton, A.J. Trewavas, & M.K. Watahiki. 2003. *Pollen tubes exhibit regular periodic membrane trafficking events in the absence of apical extension*. *J Cell Sci* **116**:2707-2719.
- Passey, R.J., K. Xu, D.A. Hume, & C.L. Geczy. 1999. *S100A8: emerging functions and regulation*. *J Leukoc Biol* **66**:549-556.
- Pastore, S., F. Mascia, V. Mariani, & G. Girolomoni. 2008. *The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation*. *J Invest Dermatol* **128**:1365-1374.
- Pauli, G., A. Purohit, J.P. Oster, F. de Blay, S. Vrtala, V. Niederberger, D. Kraft, & R. Valenta. 1999. *Clinical evaluation of genetically engineered hypoallergenic rBet v 1 derivatives*. *Int Arch Allergy Immunol* **118**:216-217.
- Pauli, G., T.H. Larsen, S. Rak, F. Horak, E. Pastorello, R. Valenta, A. Purohit, M. Arvidsson, A. Kavina, J.W. Schroeder, N. Mothes, S. Spitzauer, A. Montagut, S. Galvain, M. Melac, C. André, L.K. Poulsen, & H.J. Malling. 2008. *Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis*. *J Allergy Clin Immunol* **122**:951-960.
- Paulissen, G., N. Rocks, M.M. Gueders, D. Bedoret, C. Crahay, F. Quesada-Calvo, J. Hacha, S. Bekaert, C. Desmet, J.M. Foidart, F. Bureau, A. Noel, & D.D. Cataldo. 2011. *ADAM-8, a metalloproteinase, drives acute allergen-induced airway inflammation*. *Eur J Immunol* **41**:380-391.
- Péche, H., M. Heslan, C. Usal, S. Amigorena, & M.C. Cuturi. 2003. *Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection*. *Transplantation* **76**:1503-1510.
- Péche, H., K. Renaudin, G. Berioui, E. Merieau, S. Amigorena, & M.C. Cuturi. 2006. *Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model*. *Am J Transplant* **6**:1541-1550.

- Pegtel, D.M., K. Cosmopoulos, D.A. Thorley-Lawson, M.A. van Eijndhoven, E.S. Hopmans, J.L. Lindenberg, T.D. de Gruijl, T. Wurdinger, & J.M. Middeldorp. 2010. *Functional delivery of viral miRNAs via exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A **107**:6328-6333.
- Pelchen-Matthews, A., G. Raposo, & M. Marsh. 2004. *Endosomes, exosomes and Trojan viruses*. Trends Microbiol **12**:310-316.
- Peng, H.J., M.W. Turner, & S. Strobel. 1989. *The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration*. Immunology **67**:425-430.
- Peng, H.J., M.W. Turner, & S. Strobel. 1990. *The generation of a 'tolerogen' after the ingestion of ovalbumin is time-dependent and unrelated to serum levels of immunoreactive antigen*. Clin Exp Immunol **81**:510-515.
- Peng, Z., Y. Shen, S. Feng, X. Wang, B.N. Chitteti, R.D. Vierstra, & X.W. Deng. 2003. *Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo*. Curr Biol **13**:R504-505.
- Peng, P., Y. Yan, & S. Keng. 2011. *Exosomes in the ascites of ovarian cancer patients: origin and effects on anti-tumor immunity*. Oncol Rep **25**:749-762.
- Penido, C., H.C. Castro-Faria-Neto, A. Vieira-de-Abreu, R.T. Figueiredo, A. Pelled, M.A. Martins, P.J. Jose, T.J. Williams, & P.T. Bozza. 2001. *LPS induces eosinophil migration via CCR3 signaling through a mechanism independent of RANTES and Eotaxin*. Am J Respir Cell Mol Biol **25**:707-716.
- Penido, C., K.A. Costa, M.F. Costa, F. Pereira Jde, A.C. Siani, & M. Henriques. 2006. *Inhibition of allergen-induced eosinophil recruitment by natural tetranortriterpenoids is mediated by the suppression of IL-5, CCL11/eotaxin and NFkappaB activation*. Int Immunopharmacol **6**:109-121.
- Perälä, N., H. Sariola, & T. Immonen. 2012. *More than nervous: the emerging roles of plexins*. Differentiation **83**:77-91.
- Perkins, C., M. Wills-Karp, & F.D. Finkelman. 2006. *IL-4 induces IL-13-independent allergic airway inflammation*. J Allergy Clin Immunol **118**:410-419.
- Pesce, J., M. Kaviratne, T.R. Ramalingam, R.W. Thompson, J.F. Urban, Jr., A.W. Cheever, D.A. Young, M. Collins, M.J. Grusby, & T.A. Wynn. 2006. *The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation*. J Clin Invest **116**:2044-2055.
- Petersen, A., K. Grobe, B. Lindner, M. Schlaak, & W.M. Becker. 1997. *Comparison of natural and recombinant isoforms of grass pollen allergens*. Electrophoresis **18**:819-825.
- Petersen, A., G. Schramm, M. Schlaak, & W.M. Becker. 1998. *Post-translational modifications influence IgE reactivity to the major allergen Phl p 1 of timothy grass pollen*. Clin Exp Allergy **28**:315-321.
- Petersen, A., K. Grobe, G. Schramm, S. Vieths, F. Altmann, M. Schlaak, & W.M. Becker. 1999. *Implications of the grass group I allergens on the sensitization and provocation process*. Int Arch Allergy Immunol **118**:411-413.
- Pilling, J., L. Willmitzer, & J. Fisahn. 2000. *Expression of a Petunia inflata pectin methyl esterase in Solanum tuberosum L. enhances stem elongation and modifies cation distribution*. Planta **210**:391-399.
- Pisitkun, T., R.F. Shen, & M.A. Knepper. 2004. *Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine*. Proc Natl Acad Sci U S A **101**:13368-13373.
- Plewako, H., K. Wosinska, M. Arvidsson, J. Bjorkander, P.S. Skov, L. Hakansson, & S. Rak. 2006. *Basophil interleukin 4 and interleukin 13 production is suppressed during the early phase of rush immunotherapy*. Int Arch Allergy Immunol **141**:346-353.

- Poliakov, A., M. Spilman, T. Dokland, C.L. Amling, & J.A. Mobley. 2009. *Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen*. Prostate **69**:159-167.
- Porto-Carreiro, I., B. Fevrier, S. Paquet, D. Vilette, & G. Raposo. 2005. *Prions and exosomes: from PrPc trafficking to PrPsc propagation*. Blood Cells Mol Dis **35**:143-148.
- Potolicchio, I., G.J. Carven, X. Xu, C. Stipp, R.J. Riese, L.J. Stern, & L. Santambrogio. 2005. *Proteomic analysis of microglia-derived exosomes: metabolic role of the aminopeptidase CD13 in neuropeptide catabolism*. J Immunol **175**:2237-2243.
- Poulsen, L.K., C. Liisberg, C. Bindslev-Jensen, & H.J. Malling. 1993. *Precise area determination of skin-prick tests: validation of a scanning device and software for a personal computer*. Clin Exp Allergy **23**:61-68.
- Prausnitz, C. and H. Küstner. 1921. *Studien über die Uebermpfindlichkeit*. Zentralbl Bakteriol **86**: 160-169.
- Pribila, J.T., A.C. Quale, K.L. Mueller, & Y. Shimizu. 2004. *Integrins and T cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol **22**:157-180.
- Puggioni, F., S.R. Durham, & J.N. Francis. 2005. *Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses*. Allergy **60**:678-684.
- Purohit, A., V. Niederberger, M. Kronqvist, F. Horak, R. Gronneberg, R. Suck, B. Weber, H. Fiebig, M. van Hage, G. Pauli, R. Valenta, & O. Cromwell. 2008. *Clinical effects of immunotherapy with genetically modified recombinant birch pollen Bet v 1 derivatives*. Clin Exp Allergy **38**:1514-1525.
- Qazi, K.R., U. Gehrman, E. Domange Jordo, M.C. Karlsson, & S. Gabrielsson. 2009. *Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B-cell-dependent mechanism*. Blood **113**:2673-2683.
- Qazi, K.R., P. Torregrosa-Paredes, B. Dahlberg, J. Grunewald, A. Eklund, & S. Gabrielsson. 2010. *Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis*. Thorax **65**:1016-1024.
- Quinteiro, M. 2000. *Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). Tecnology for the identification of organisms*. Clin Microbiol Newsl **22**:57-61.
- Quiralte, J., E. González, J.M. Arias De Saavedra, M. Villalba, J.F. Florido, B. Saenz De San Pedro, & R. Rodríguez. 2000. *Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with Olea europaea pollinosis*. Int Arch Allergy Immunol **122**:101-107.
- Quiralte, J., E. Llanes, P. Barral, J.M. Arias de Saavedra, B. Saenz de San Pedro, M. Villalba, J.F. Florido, R. Rodríguez, C. Lahoz, & B. Cárda. 2005. *Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy*. Allergy **60**:360-365.
- Quiralte, J., L. Palacios, R. Rodríguez, B. Cárda, J.M. Arias de Saavedra, M. Villalba, J.F. Florido, & C. Lahoz. 2007. *Modelling diseases: the allergens of Olea europaea pollen*. J Investig Allergol Clin Immunol **17 Suppl 1**:24-30.
- Rabinowits, G., C. Gercel-Taylor, J.M. Day, D.D. Taylor, & G.H. Kloecker. 2009. *Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer*. Clin Lung Cancer **10**:42-46.
- Rai, D., S.W. Kim, M.R. McKeller, P.L. Dahia, & R.C. Aguiar. 2010. *Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF-beta pathway and lymphomagenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A **107**:3111-3116.
- Rajendran, L., M. Honsho, T.R. Zahn, P. Keller, K.D. Geiger, P. Verkade, & K. Simons. 2006. *Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:11172-11177.
- Rak, S. 2009. *Clinical results with a hypoallergenic recombinant birch pollen allergen derivative*. Presented at 27th Congr., EAACI, Warsaw, June 6-10.

- Ramachandran, S., H.E. Christensen, Y. Ishimaru, C.H. Dong, W. Chao-Ming, A.L. Cleary, & N.H. Chua. 2000. *Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis*. *Plant Physiol* **124**:1637-1647.
- Randow, F., & B. Seed. 2001. *Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability*. *Nat Cell Biol* **3**:891-896.
- Raposo, G., H.M. van Santen, R. Leijendekker, H.J. Geuze, & H.L. Ploegh. 1995. *Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-Golgi intermediate compartment*. *J Cell Biol* **131**:1403-1419.
- Raposo, G., H.W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C.V. Harding, C.J. Melief, & H.J. Geuze. 1996. *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. *J Exp Med* **183**:1161-1172.
- Ratajczak, J., K. Miekus, M. Kucia, J. Zhang, R. Reca, P. Dvorak, & M.Z. Ratajczak. 2006. *Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery*. *Leukemia* **20**:847-856.
- Read, S., & F. Powrie. 2001. *CD4(+) regulatory T cells*. *Curr Opin Immunol* **13**:644-649.
- Regente, M., G. Corti-Monzon, A.M. Maldonado, M. Pinedo, J. Jorin, & L. de la Canal. 2009. *Vesicular fractions of sunflower apoplastic fluids are associated with potential exosome marker proteins*. *FEBS Lett* **583**:3363-3366.
- Regente, M., M. Pinedo, M. Elizalde, & L. de la Canal. 2012. *Apoplastic exosome-like vesicles: a new way of protein secretion in plants?* *Plant Signal Behav* **7**:544-546.
- Reinhardt, H.C., P. Hasskamp, I. Schmedding, S. Morandell, M.A. van Vugt, X. Wang, R. Linding, S.E. Ong, D. Weaver, S.A. Carr, & M.B. Yaffe. 2010. *DNA damage activates a spatially distinct late cytoplasmic cell-cycle checkpoint network controlled by MK2-mediated RNA stabilization*. *Mol Cell* **40**:34-49.
- Reisinger, J., F. Horak, G. Pauli, M. van Hage, O. Cromwell, F. Konig, R. Valenta, & V. Niederberger. 2005. *Allergen-specific nasal IgG antibodies induced by vaccination with genetically modified allergens are associated with reduced nasal allergen sensitivity*. *J Allergy Clin Immunol* **116**:347-354.
- Ren, X.P., J. Wu, X. Wang, M.A. Sartor, J. Qian, K. Jones, P. Nicolaou, T.J. Pritchard, & G.C. Fan. 2009. *MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20*. *Circulation* **119**:2357-2366.
- Renkonen, J., P. Mattila, S. Lehti, J. Makinen, R. Sormunen, T. Tervo, T. Paavonen, & R. Renkonen. 2009. *Birch pollen allergen Bet v 1 binds to and is transported through conjunctival epithelium in allergic patients*. *Allergy* **64**:868-875.
- Rialland, P., D. Lankar, G. Raposo, C. Bonnerot, & P. Hubert. 2006. *BCR-bound antigen is targeted to exosomes in human follicular lymphoma B-cells*. *Biol Cell* **98**:491-501.
- Ridley, A.J. 2001. *Rho family proteins: coordinating cell responses*. *Trends Cell Biol* **11**:471-477.
- Roadcap, D.W., C.S. Clemen, & J.E. Bear. 2008. *The role of mammalian coronins in development and disease*. *Subcell Biochem* **48**:124-135.
- Roberts, A.M., R. Van Ree, S.M. Cardy, L.J. Bevan, & M.R. Walker. 1992. *Recombinant pollen allergens from Dactylis glomerata: preliminary evidence that human IgE cross-reactivity between Dac g II and Lol p I/II is increased following grass pollen immunotherapy*. *Immunology* **76**:389-396.

- Roccaro, A.M., A. Sacco, B. Thompson, X. Leleu, A.K. Azab, F. Azab, J. Runnels, X. Jia, H.T. Ngo, M.R. Melhem, C.P. Lin, D. Ribatti, B.J. Rollins, T.E. Witzig, K.C. Anderson, & I.M. Ghobrial. 2009. *MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma*. Blood **113**:6669-6680.
- Rodrigues, M.L., J.D. Nosanchuk, A. Schrank, M.H. Vainstein, A. Casadevall, & L. Nimrichter. 2011. *Vesicular transport systems in fungi*. Future Microbiol **6**:1371-1381.
- Rodríguez-García, M.I., M. M'Rani-Alaoui, & M.C. Fernández. 2003. *Behavior of storage lipids during development and germination of olive (Olea europaea L.) pollen*. Protoplasma **221**:237-244.
- Rodríguez-Riano, T., & A. Dafni. 2007. *Pollen-stigma interference in two gynodioecious species of Lamiaceae with intermediate individuals*. Ann Bot **100**:423-431.
- Rodríguez, R., Monsalve, R.I., Batanero, E., Ledesma, A., Gómez, E., Tejera, M.L., Huecas, S., M. García, & I. García. 1998. *Perfiles de reconocimiento alergénico de polen de olivo. Implicación en diagnosis e inmunoterapia*. Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat **93**: 253:252.
- Rodríguez, R., M. Villalba, R.I. Monsalve, & E. Batanero. 2001. *The spectrum of olive pollen allergens*. Int Arch Allergy Immunol **125**:185-195.
- Rodríguez, R., M. Villalba, E. Batanero, E.M. González, R.I. Monsalve, S. Huecas, M.L. Tejera, & A. Ledesma. 2002. *Allergenic diversity of the olive pollen*. Allergy **57 Suppl 71**:6-16.
- Rodríguez, R., M. Villalba, E. Batanero, O. Palomares, J. Quiralte, G. Salamanca, S. Sirvent, L. Castro, & N. Prado. 2007. *Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy*. J Invest Allergol Clin Immunol **17 Suppl 1**:4-10.
- Rogel, M.R., P.N. Soni, J.R. Troken, A. Sitikov, H.E. Trejo, & K.M. Ridge. 2011. *Vimentin is sufficient and required for wound repair and remodeling in alveolar epithelial cells*. FASEB J **25**:3873-3883.
- Roncarolo, M.G., M.K. Levings, & C. Traversari. 2001. *Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells*. J Exp Med **193**:F5-9.
- Röschmann, K., K. Farhat, P. König, R. Suck, A.J. Ulmer, & A. Petersen. 2009. *Timothy grass pollen major allergen Phl p 1 activates respiratory epithelial cells by a non-protease mechanism*. Clin Exp Allergy **39**:1358-1369.
- Rossato, M., G. Curtale, N. Tamassia, M. Castellucci, L. Mori, S. Gasperini, B. Mariotti, M. De Luca, M. Mirolo, M.A. Cassatella, M. Locati, & F. Bazzoni. 2012. *IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF-alpha, IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A **109**:E3101-3110.
- Rothenberg, M.E., & S.P. Hogan. 2006. *The eosinophil*. Annu Rev Immunol **24**:147-174.
- Roy, K., H.Q. Mao, S.K. Huang, & K.W. Leong. 1999. *Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy*. Nat Med **5**:387-391.
- Ruddy, A.C., McNally, G., Nersisyan, G., W.G. Graham, & W.R. Murphy. 2006. *The effect of atmospheric glow discharge (APGD) treatment on polyetherimide, polybutyleneterephthalate, and polyamides*. J Plast Film & Sheet **22**:103-119.
- Ryckman, C., K. Vandal, P. Rouleau, M. Talbot, & P.A. Tessier. 2003. *Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion*. J Immunol **170**:3233-3242.
- Sadallah, S., C. Eken, & J.A. Schifferli. 2011. *Ectosomes as modulators of inflammation and immunity*. Clin Exp Immunol **163**:26-32.
- Saeed, A.I., N.K. Bhagabati, J.C. Braisted, W. Liang, V. Sharov, E.A. Howe, J. Li, M. Thiagarajan, J.A. White, & J. Quackenbush. 2006. *TM4 microarray software suite*. Methods Enzymol **411**:134-193.

- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., M. Itho, & M. Toda. 1995. *Immunological self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol **155**(3): 1151-1164.
- Salamanca, G., R. Rodríguez, J. Quiralte, C. Moreno, C.Y. Pascual, D. Barber, & M. Villalba. 2010. *Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree*. FEBS J **277**:2729-2739.
- Sallusto, F., & A. Lanzavecchia. 2009. *Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity*. Eur J Immunol **39**:2076-2082.
- Samaj, J., J. Müller, M. Beck, N. Bohm, & D. Menzel. 2006. *Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes*. Trends Plant Sci **11**:594-600.
- Sánchez-Cuenca, B. 1934. *Polinosis (Asma de heno). Estudio botánico y clínico del problema*. Barcelona. Ed. Científico-Médica.
- Sanz, M.L., M.C. García-Aviles, A.I. Tabar, M. Anda, B.E. García, D. Barber, G. Salcedo, H.P. Rihs, & M. Raulf-Heimsoth. 2006. *Basophil Activation Test and specific IgE measurements using a panel of recombinant natural rubber latex allergens to determine the latex allergen sensitization profile in children*. Pediatr Allergy Immunol **17**:148-156.
- Saraiva, M.J. 1995. *Transthyretin mutations in health and disease*. Hum Mutat **5**:191-196.
- Sarhill, N., F. Mahmoud, D. Walsh, K.A. Nelson, S. Komurcu, M. Davis, S. LeGrand, O. Abdullah, & L. Rybicki. 2003. *Evaluation of nutritional status in advanced metastatic cancer*. Support Care Cancer **11**:652-659.
- Sato, M.N., A.F. Carvalho, A.O. Silva, M. Maclel, Jr., A.E. Fusaro, & A.J. Duarte. 1998. *Oral tolerance induced to house dust mite extract in naive and sensitized mice: evaluation of immunoglobulin G anti-immunoglobulin E autoantibodies and IgG-IgE complexes*. Immunology **95**:193-199.
- Schafer, D.A., S.R. Gill, J.A. Cooper, J.E. Heuser, & T.A. Schroer. 1994. *Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin*. J Cell Biol **126**:403-412.
- Schäppi, G.F., C. Suphioglu, P.E. Taylor, & R.B. Knox. 1997. *Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere*. J Allergy Clin Immunol **100**:656-661.
- Schäppi, G.F., P.E. Taylor, M.C. Pain, P.A. Cameron, A.W. Dent, I.A. Staff, & C. Suphioglu. 1999a. *Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens*. Clin Exp Allergy **29**:633-641.
- Schäppi, G.F., P.E. Taylor, I.A. Staff, J.M. Rolland, & C. Suphioglu. 1999b. *Immunologic significance of respirable atmospheric starch granules containing major birch allergen Bet v 1*. Allergy **54**:478-483.
- Schembri, F., S. Sridhar, C. Perdomo, A.M. Gustafson, X. Zhang, A. Ergun, J. Lu, G. Liu, J. Bowers, C. Vaziri, K. Ott, K. Sensinger, J.J. Collins, J.S. Brody, R. Getts, M.E. Lenburg, & A. Spira. 2009. *MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A **106**:2319-2324.
- Schena, M., D. Shalon, R.W. Davis, & P.O. Brown. 1995. *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. Science **270**:467-470.
- Schiefelbein, J., M. Galway, J. Masucci, & S. Ford. 1993. *Pollen tube and root-hair tip growth is disrupted in a mutant of Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol **103**:979-985.
- Schleh, C., V.J. Erpenbeck, C. Winkler, H.D. Lauenstein, M. Nassimi, A. Braun, N. Krug, & J.M. Hohlfeld. 2010. *Allergen particle binding by human primary bronchial epithelial cells is modulated by surfactant protein D*. Respir Res **11**:83.

- Schlenker, O., A. Hendricks, I. Sinning, & K. Wild. 2006. *The structure of the mammalian signal recognition particle (SRP) receptor as prototype for the interaction of small GTPases with Longin domains*. J Biol Chem **281**:8898-8906.
- Schroer, T.A. 2004. *Dynactin*. Annu Rev Cell Dev Biol **20**:759-779.
- Schwechheimer, C., & X.W. Deng. 2001. *COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation*. Trends Cell Biol **11**:420-426.
- Schwechheimer, C. 2004. *The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development*. Biochim Biophys Acta **1695**:45-54.
- Segura, E., S. Amigorena, & C. Théry. 2005a. *Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses*. Blood Cells Mol Dis **35**:89-93.
- Segura, E., C. Nicco, B. Lombard, P. Veron, G. Raposo, F. Batteux, S. Amigorena, & C. Théry. 2005b. *ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming*. Blood **106**:216-223.
- Segura, E., C. Guerin, N. Hogg, S. Amigorena, & C. Théry. 2007. *CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo*. J Immunol **179**:1489-1496.
- Sethupathy, P., M. Megraw, & A.G. Hatzigeorgiou. 2006. *A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets*. Nat Methods **3**:881-886.
- Sevignani, C., G.A. Calin, L.D. Siracusa, & C.M. Croce. 2006. *Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression*. Mamm Genome **17**:189-202.
- Seymour, B.W., L.J. Gershwin, & R.L. Coffman. 1998. *Aerosol-induced immunoglobulin (Ig)-E unresponsiveness to ovalbumin does not require CD8+ or T cell receptor (TCR)-gamma/delta+ T cells or interferon (IFN)-gamma in a murine model of allergen sensitization*. J Exp Med **187**:721-731.
- Shanahan, C.M. 2005. *Vascular calcification*. Curr Opin Nephrol Hypertens **14**:361-367.
- Shaulian, E. 2010. *AP-1-The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise?* Cell Signal **22**:894-899.
- Shcherbina, A., A. Bretscher, D.M. Kenney, & E. Remold-O'Donnell. 1999. *Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain*. FEBS Lett **443**:31-36.
- Sheoran, I.S., A.R. Ross, D.J. Olson, & V.K. Sawhney. 2007. *Proteomic analysis of tomato (Lycopersicon esculentum) pollen*. J Exp Bot **58**:3525-3535.
- Sheoran, I.S., E.J. Pedersen, A.R. Ross, & V.K. Sawhney. 2009. *Dynamics of protein expression during pollen germination in canola (Brassica napus)*. Planta **230**:779-793.
- Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, & M. Mann. 1996. *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels*. Anal Chem **68**:850-858.
- Shi, P., & J. Zhang. 2007. *Comparative genomic analysis identifies an evolutionary shift of vomeronasal receptor gene repertoires in the vertebrate transition from water to land*. Genome Res **17**:166-174.
- Shimaoka, M., T. Xiao, J.H. Liu, Y. Yang, Y. Dong, C.D. Jun, A. McCormack, R. Zhang, A. Joachimiak, J. Takagi, J.H. Wang, & T.A. Springer. 2003. *Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation*. Cell **112**:99-111.
- Shing, Y., Kaul, V., Mehra, A., Chatterjee, S., Tousif, S., Dwivedi, V.P., Suar, M., Van Kaer, L., W.R., Bishai, & G. Das. 2012. *Mycobacterium tuberculosis controls miR-99b expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity*. J Bio Chem (in press).

- Shiow, L.R., D.W. Roadcap, K. Paris, S.R. Watson, I.L. Grigorova, T. Lebet, J. An, Y. Xu, C.N. Jenne, N. Föger, R.U. Sorensen, C.C. Goodnow, J.E. Bear, J.M. Puck, & J.G. Cyster. 2008. *The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency*. Nat Immunol **9**:1307-1315.
- Shpakovski, G.V., J. Acker, M. Wintzerith, J.F. Lacroix, P. Thuriaux, & M. Vigneron. 1995. *Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between Homo sapiens and Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol **15**:4702-4710.
- Silverman, J.M., J. Clos, E. Horakova, A.Y. Wang, M. Wiesgigl, I. Kelly, M.A. Lynn, W.R. McMaster, L.J. Foster, M.K. Levings, & N.E. Reiner. 2010. *Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells*. J Immunol **185**:5011-5022.
- Simons, F.E., M. Imada, Y. Li, W.T. Watson, & K.T. HayGlass. 1996. *Fel d 1 peptides: effect on skin tests and cytokine synthesis in cat-allergic human subjects*. Int Immunol **8**:1937-1945.
- Simons, M., & G. Raposo. 2009. *Exosomes-vesicular carriers for intercellular communication*. Curr Opin Cell Biol **21**:575-581.
- Simons, F.E. 2010. *Anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol **125**:S161-181.
- Sin, W.C., X.Q. Chen, T. Leung, & L. Lim. 1998. *RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network*. Mol Cell Biol **18**:6325-6339.
- Singh, M., T. Madan, P. Waters, S.K. Parida, P.U. Sarma, & U. Kishore. 2003. *Protective effects of a recombinant fragment of human surfactant protein D in a murine model of pulmonary hypersensitivity induced by dust mite allergens*. Immunol Lett **86**:299-307.
- Sirvent, S., L. Tordesillas, M. Villalba, A. Díaz-Perales, J. Cuesta-Herránz, G. Salcedo, & R. Rodríguez. 2011. *Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity*. Ann Allergy Asthma Immunol **106**:429-435.
- Skog, J., T. Wurdinger, S. van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W.T. Curry, Jr., B.S. Carter, A.M. Krichevsky, & X.O. Breakefield. 2008. *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol **10**:1470-1476.
- Skokos, D., S. Le Panse, I. Villa, J.C. Rousselle, R. Peronet, B. David, A. Namane, & S. Mecheri. 2001. *Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes*. J Immunol **166**:868-876.
- Slater, J.E., E. Paupore, Y.T. Zhang, & A.M. Colberg-Poley. 1998. *The latex allergen Hev b 5 transcript is widely distributed after subcutaneous injection in BALB/c mice of its DNA vaccine*. J Allergy Clin Immunol **102**:469-475.
- Smalley, D.M., N.E. Sheman, K. Nelson, & D. Theodorescu. 2008. *Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer*. J Proteome Res **7**:2088-2096.
- Somlyo, A.P., & A.V. Somlyo. 2000. *Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II*. J Physiol **522 Pt 2**:177-185.
- Sonkoly, E., P. Janson, M.L. Majuri, T. Savinko, N. Fyhrquist, L. Eidsmo, N. Xu, F. Meisgen, T. Wei, M. Bradley, J. Stenvang, S. Kauppinen, H. Alenius, A. Lauerma, B. Homey, O. Winqvist, M. Stahle, & A. Pivarcsi. 2010. *MiR-155 is overexpressed in patients with atopic dermatitis and modulates T-cell proliferative responses by targeting cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Allergy Clin Immunol **126**:581-589 e581-520.
- Spehr, M., G. Gisselmann, A. Poplawski, J.A. Riffell, C.H. Wetzel, R.K. Zimmer, & H. Hatt. 2003. *Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis*. Science **299**:2054-2058.

- Spieksma, F.T., J.A. Kramps, A.C. van der Linden, B.H. Nikkels, A. Plomp, H.K. Koerten, & J.H. Dijkman. 1990. *Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction*. Clin Exp Allergy **20**:273-280.
- Spieksma, F.T., B.H. Nikkels, & J.H. Dijkman. 1995. *Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration*. Clin Exp Allergy **25**:234-239.
- Steinert, P.M., J.C. Jones, & R.D. Goldman. 1984. *Intermediate filaments*. J Cell Biol **99**:22s-27s.
- Steinke, J.W., S.S. Rich, & L. Borish. 2008. 5. *Genetics of allergic disease*. J Allergy Clin Immunol **121**:S384-387; quiz S416.
- Stinchcombe, J.C., & G.M. Griffiths. 2007. *Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Cell Dev Biol **23**:495-517.
- Stoeck, A., S. Keller, S. Riedle, M.P. Sanderson, S. Runz, F. Le Naour, P. Gutwein, A. Ludwig, E. Rubinstein, & P. Altevogt. 2006. *A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44*. Biochem J **393**:609-618.
- Stoorvogel, W., M.J. Kleijmeer, H.J. Geuze, & G. Raposo. 2002. *The biogenesis and functions of exosomes*. Traffic **3**:321-330.
- Strauss, K., C. Goebel, H. Runz, W. Mobius, S. Weiss, I. Feussner, M. Simons, & A. Schneider. 2010. *Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease*. J Biol Chem **285**:26279-26288.
- Strobel, S., A.M. Mowat, H.E. Drummond, M.G. Pickering, & A. Ferguson. 1983. *Immunological responses to fed protein antigens in mice. II. Oral tolerance for CMI is due to activation of cyclophosphamide-sensitive cells by gut-processed antigen*. Immunology **49**:451-456.
- Strobel, S., & A.M. Mowat. 1998. *Immune responses to dietary antigens: oral tolerance*. Immunol Today **19**:173-181.
- Stuart, B.H. 1996. *A Fourier transform infrared spectroscopic study of the secondary structure of myelin basic protein in reconstituted myelin*. Biochem Mol Biol Int **38**:839-845.
- Stucke, V.M., E. Timmerman, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, & A. Hall. 2007. *The MAGUK protein MPP7 binds to the polarity protein hDlg1 and facilitates epithelial tight junction formation*. Mol Biol Cell **18**:1744-1755.
- Subiza, F.J., Pola, J.P., F.F. Brito, & A.J. Moral de Gregorio. 2007a. *Pólenes de interés en alergología en nuestro medio. Tratado de Alergología*. Spain. Ed Ergon 425-443.
- Subiza, F.J. 2007b. *Recuento de pólenes. Tratado de Alergología*. Spain. Ed Ergon 415-424.
- Sun, Y.L., W.W. Cui, X.H. Gu, J. Tang, & R.L. Shen. 2009. *[Determination of degree of esterification in pectic polysaccharides from Angelica sinensis (Oliv.) diels by Fourier transform infrared spectroscopy]*. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi **29**:682-685.
- Sun, J.B., C. Czerkinsky, & J. Holmgren. 2010. *Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit*. Scand J Immunol **71**:1-11.
- Sun, D., Y.S. Lee, A. Malhotra, H.K. Kim, M. Matecic, C. Evans, R.V. Jensen, C.A. Moskaluk, & A. Dutta. 2011. *miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation*. Cancer Res **71**:1313-1324.

- Swarr, D.T., & H. Hakonarson. 2010. *Unraveling the complex genetic underpinnings of asthma and allergic disorders*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **10**:434-442.
- Szklarczyk, D., A. Franceschini, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, P. Minguéz, T. Doerks, M. Stark, J. Müller, P. Bork, L.J. Jensen, & C. von Mering. 2011. *The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored*. *Nucleic Acids Res* **39**:D561-568.
- Taams, L.S., W. van Eden, & M.H. Wauben. 1999. *Dose-dependent induction of distinct anergic phenotypes: multiple levels of T cell anergy*. *J Immunol* **162**:1974-1981.
- Takahashi, G., H. Tanaka, K. Wakahara, R. Nasu, M. Hashimoto, K. Miyoshi, H. Takano, H. Yamashita, N. Inagaki, & H. Nagai. 2010. *Effect of diesel exhaust particles on house dust mite-induced airway eosinophilic inflammation and remodeling in mice*. *J Pharmacol Sci* **112**:192-202.
- Tang, W., I. Ezcurra, J. Muschietti, & S. McCormick. 2002. *A cysteine-rich extracellular protein, LAT52, interacts with the extracellular domain of the pollen receptor kinase LePRK2*. *Plant Cell* **14**:2277-2287.
- Tang, H.L., H.L. Lung, K.C. Wu, A.H. Le, H.M. Tang, & M.C. Fung. 2008. *Vimentin supports mitochondrial morphology and organization*. *Biochem J* **410**:141-146.
- Tarzi, M., S. Klunker, C. Texier, A. Verhoef, S.O. Stapel, C.A. Akdis, B. Maillere, A.B. Kay, & M. Larche. 2006. *Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy*. *Clin Exp Allergy* **36**:465-474.
- Taylor, P.E., I.A. Staff, M.B. Singh, & R.B. Knox. 1994. *Localization of the two major allergens in rye-grass pollen using specific monoclonal antibodies and quantitative analysis of immunogold labelling*. *Histochem J* **26**:392-401.
- Taylor, D.D., C. Gercel-Taylor, K.S. Lyons, J. Stanson, & T.L. Whiteside. 2003. *T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors*. *Clin Cancer Res* **9**:5113-5119.
- Taylor, P.E., R.C. Flagan, A.G. Miguel, R. Valenta, & M.M. Glovsky. 2004. *Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens*. *Clin Exp Allergy* **34**:1591-1596.
- Taylor, D.D., S. Akyol, & C. Gercel-Taylor. 2006. *Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling*. *J Immunol* **176**:1534-1542.
- Taylor, C.F., N.W. Paton, K.S. Lilley, P.A. Binz, R.K. Julian, Jr., A.R. Jones, W. Zhu, R. Apweiler, R. Aebersold, E.W. Deutsch, M.J. Dunn, A.J. Heck, A. Leitner, M. Macht, M. Mann, L. Martens, T.A. Neubert, S.D. Patterson, P. Ping, S.L. Seymour, P. Souda, A. Tsugita, J. Vandekerckhove, T.M. Vondriska, J.P. Whitelegge, M.R. Wilkins, I. Xenarios, J.R. Yates, 3rd, & H. Hermjakob. 2007a. *The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE)*. *Nat Biotechnol* **25**:887-893.
- Taylor, P.E., K.W. Jacobson, J.M. House, & M.M. Glovsky. 2007b. *Links between pollen, atopy and the asthma epidemic*. *Int Arch Allergy Immunol* **144**:162-170.
- Taylor, D.D., & C. Gercel-Taylor. 2008. *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. *Gynecol Oncol* **110**:13-21.
- Tejera, M.L., M. Villalba, E. Batanero, & R. Rodríguez. 1999. *Identification, isolation, and characterization of Ole e 7, a new allergen of olive tree pollen*. *J Allergy Clin Immunol* **104**:797-802.
- Teran, L.M., M. Mochizuki, J. Bartels, E.L. Valencia, T. Nakajima, K. Hirai, & J.M. Schroder. 1999. *Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts*. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**:777-786.

- Théry, C., M. Boussac, P. Veron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, & S. Amigorena. 2001. *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles*. *J Immunol* **166**:7309-7318.
- Théry, C., S. Amigorena, G. Raposo, & A. Clayton. 2006. *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**:Unit 3 22.
- Théry, C., M. Ostrowski, & E. Segura. 2009. *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. *Nat Rev Immunol* **9**:581-593.
- Thompson, E.G., L. Schaheen, H. Dang, & H. Fares. 2007. *Lysosomal trafficking functions of mucolipin-1 in murine macrophages*. *BMC Cell Biol* **8**:54.
- Till, S.J., J.N. Francis, K. Nouri-Aria, & S.R. Durham. 2004. *Mechanisms of immunotherapy*. *J Allergy Clin Immunol* **113**:1025-1034; quiz 1035.
- Torregrosa-Paredes, P., J. Esser, C. Admyre, M. Nord, Q.K. Rahman, A. Lukic, O. Radmark, R. Gronneberg, J. Grunewald, A. Eklund, A. Scheynius, & S. Gabrielsson. 2012. *Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma*. *Allergy* **67**:911-919.
- Towbin, H., T. Staehelin, & J. Gordon. 1979. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4354.
- Trajkovski, M., J. Hausser, J. Soutschek, B. Bhat, A. Akin, M. Zavolan, M.H. Heim, & M. Stoffel. 2011. *MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity*. *Nature* **474**:649-653.
- Tran, D.Q. 2012. *TGF-beta: the sword, the wand, and the shield of FOXP3(+) regulatory T cells*. *J Mol Cell Biol* **4**:29-37.
- Tsitoura, D.C., R.L. Blumenthal, G. Berry, R.H. Dekruyff, & D.T. Umetsu. 2000. *Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperreactivity: role of tolerance and immune deviation*. *J Allergy Clin Immunol* **106**:239-246.
- Tulic, M.K., P.O. Fiset, P. Christodouloupoulos, P. Vaillancourt, M. Desrosiers, F. Lavigne, J. Eiden, & Q. Hamid. 2004. *Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response*. *J Allergy Clin Immunol* **113**:235-241.
- Turcatel, G., N. Rubin, A. El-Hashash, & D. Warburton. 2012. *MIR-99a and MIR-99b modulate TGF-beta induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells*. *PLoS One* **7**:e31032.
- Turi, G.J., R. Ellis, J.N. Wattie, N.R. Labiris, & M.D. Inman. 2011. *The effects of inhaled house dust mite on airway barrier function and sensitivity to inhaled methacholine in mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **300**:L185-190.
- Turiak, L., P. Misjak, T.G. Szabo, B. Aradi, K. Paloczi, O. Ozohanics, L. Drahos, A. Kittel, A. Falus, E.I. Buzas, & K. Vekey. 2011. *Proteomic characterization of thymocyte-derived microvesicles and apoptotic bodies in BALB/c mice*. *J Proteomics* **74**:2025-2033.
- Twell, D., R. Wing, J. Yamaguchi, & S. McCormick. 1989. *Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato*. *Mol Gen Genet* **217**:240-245.
- Uesugi, A., K. Kozaki, T. Tsuruta, M. Furuta, K. Morita, I. Imoto, K. Omura, & J. Inazawa. 2011. *The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer*. *Cancer Res* **71**:5765-5778.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, & J.O. Lotvall. 2007. *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. *Nat Cell Biol* **9**:654-659.

- Valenta, R., M. Duchene, C. Ebner, P. Valent, C. Sillaber, P. Deviller, F. Ferreira, M. Tejkl, H. Edelmann, D. Kraft, & et al. 1992. *Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergens*. J Exp Med **175**:377-385.
- Valenta, R., A. Twardosz, S. Vrtala, & D. Kraft. 1999. *Large scale production and quality criteria of recombinant allergens*. Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M 211-224; discussion 224-215.
- Valenta, R., F. Ferreira, M. Focke-Tejkl, B. Linhart, V. Niederberger, I. Swoboda, & S. Vrtala. 2010. *From allergen genes to allergy vaccines*. Annu Rev Immunol **28**:211-241.
- Valenta, R., K. Niespodziana, M. Focke-Tejkl, K. Marth, H. Huber, A. Neubauer, & V. Niederberger. 2011. *Recombinant allergens: what does the future hold?* J Allergy Clin Immunol **127**:860-864.
- Valovirta, E., L. Jacobsen, C. Ljorring, A. Koivikko, & J. Savolainen. 2006. *Clinical efficacy and safety of sublingual immunotherapy with tree pollen extract in children*. Allergy **61**:1177-1183.
- Valster, A.H., E.S. Pierson, R. Valenta, P.K. Hepler, & A. Emons. 1997. *Probing the Plant Actin Cytoskeleton during Cytokinesis and Interphase by Profilin Microinjection*. Plant Cell **9**:1815-1824.
- Vallhov, H., C. Gutzeit, S.M. Johansson, N. Nagy, M. Paul, Q. Li, S. Friend, T.C. George, E. Klein, A. Scheynius, & S. Gabrielsson. 2011. *Exosomes containing glycoprotein 350 released by EBV-transformed B cells selectively target B cells through CD21 and block EBV infection in vitro*. J Immunol **186**:73-82.
- van Deurs, B., P.K. Holm, L. Kayser, K. Sandvig, & S.H. Hansen. 1993. *Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes*. Eur J Cell Biol **61**:208-224.
- van Dyken, S.J., & R.M. Locksley. 2013. *Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease*. Annu Rev Immunol (in press).
- van Eldik, G.J., R.K. Ruiter, P.H. Colla, M.M. van Herpen, J.A. Schrauwen, & G.J. Wullems. 1997. *Expression of an isoflavone reductase-like gene enhanced by pollen tube growth in pistils of Solanum tuberosum*. Plant Mol Biol **33**:923-929.
- van Hage-Hamsten, M., M. Kronqvist, O. Zetterstrom, E. Johansson, V. Niederberger, S. Vrtala, H. Gronlund, R. Gronneberg, & R. Valenta. 1999. *Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1: results obtained with a mix of two recombinant Bet v 1 fragments and recombinant Bet v 1 trimer in a Swedish population before the birch pollen season*. J Allergy Clin Immunol **104**:969-977.
- Van Houten, N., & S.F. Blake. 1996. *Direct measurement of anergy of antigen-specific T cells following oral tolerance induction*. J Immunol **157**:1337-1341.
- van Niel, G., G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan, & M. Heyman. 2001. *Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles*. Gastroenterology **121**:337-349.
- van Niel, G., J. Mallegol, C. Bevilacqua, C. Candalh, S. Brugiere, E. Tomaskovic-Crook, J.K. Heath, N. Cerf-Bensussan, & M. Heyman. 2003. *Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice*. Gut **52**:1690-1697.
- van Parijs, L., V.L. Perez, & A.K. Abbas. 1998. *Mechanisms of peripheral T cell tolerance*. Novartis Found Symp **215**:5-14; discussion 14-20, 33-40.
- van Ree, R., D.R. Hoffman, W. van Dijk, V. Brodard, K. Mahieu, C.A. Koeleman, M. Grande, W.A. van Leeuwen, & R.C. Aalberse. 1995. *Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins*. J Allergy Clin Immunol **95**:970-978.
- Van Ree, R., W.A. Van Leeuwen, P.H. Dieges, R.G. Van Wijk, N. De Jong, P.Z. Brewczynski, A.M. Kroon, P.P. Schilte, K.Y. Tan, I.F. Simon-Licht, A.M. Roberts, S.O. Stapel, & R.C. Aalberse. 1997. *Measurement of IgE antibodies*

- against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* **27**:68-74.
- van Ree, R., M. Cabanes-Macheteau, J. Akkerdaas, J.P. Milazzo, C. Loutelier-Bourhis, C. Rayon, M. Villalba, S. Koppelman, R. Aalberse, R. Rodríguez, L. Faye, & P. Lerouge. 2000. *Beta(1,2)-xylose and alpha(1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens*. *J Biol Chem* **275**:11451-11458.
- Vanderhaeghen, P., S. Schurmans, G. Vassart, & M. Parmentier. 1997. *Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species*. *Genomics* **39**:239-246.
- Vartiainen, M.K. 2008. *Nuclear actin dynamics-from form to function*. *FEBS Lett* **582**:2033-2040.
- Vasudevan, S., Y. Tong, & J.A. Steitz. 2007. *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. *Science* **318**:1931-1934.
- Vega, V.L., M. Rodríguez-Silva, T. Frey, M. Gehrmann, J.C. Díaz, C. Steinem, G. Multhoff, N. Arispe, & A. De Maio. 2008. *Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages*. *J Immunol* **180**:4299-4307.
- Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm, & B. Stockinger. 2008. *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. *Nat Immunol* **9**:1341-1346.
- Vergoulis, T., I.S. Vlachos, P. Alexiou, G. Georgakilas, M. Maragkakis, M. Reczko, S. Gerangelos, N. Koziris, T. Dalamagas, & A.G. Hatzigeorgiou. 2012. *TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support*. *Nucleic Acids Res* **40**:D222-229.
- Viaud, S., M. Terme, C. Flament, J. Taieb, F. André, S. Novault, B. Escudier, C. Robert, S. Caillat-Zucman, T. Tursz, L. Zitvogel, & N. Chaput. 2009. *Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha*. *PLoS One* **4**:e4942.
- Vidal, M., J. Sainte-Marie, J.R. Philippot, & A. Bienvenue. 1989. *Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for "aminophospholipid translocase"*. *J Cell Physiol* **140**:455-462.
- Vidal, M., P. Mangeat, & D. Hoekstra. 1997. *Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation*. *J Cell Sci* **110 (Pt 16)**:1867-1877.
- Vidali, L., C.M. Rounds, P.K. Hepler, & M. Bezanilla. 2009. *Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells*. *PLoS One* **4**:e5744.
- Vieths, S., D. Luttkopf, J. Reindl, M.D. Anliker, B. Wuthrich, & B.K. Ballmer-Weber. 2002. *Allergens in celery and zucchini*. *Allergy* **57 Suppl 72**:100-105.
- Vikstrom, K.L., R.K. Miller, & R.D. Goldman. 1991. *Analyzing dynamic properties of intermediate filaments*. *Methods Enzymol* **196**:506-525.
- Villalba, M., E. Batanero, C. Lopez-Otín, L.M. Sánchez, R.I. Monsalve, M.A. González de la Pena, C. Lahoz, & R. Rodríguez. 1993. *The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (Olea europaea) pollen*. *Eur J Biochem* **216**:863-869.
- Villalba, M., E. Batanero, R.I. Monsalve, M.A. González de la Pena, C. Lahoz, & R. Rodríguez. 1994. *Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity*. *J Biol Chem* **269**:15217-15222.
- Vinay, P., & W.H. Lewis. 1986. *Pollen morphology, allergenicity and aerobiology of the Oleaceae*. Presented at 3th International Conference on Aerobiology, Basel (Abstract 56).

- Vinckier, S., & E. Smets. 2001. *The potential role of orbicules as a vector of allergens*. *Allergy* **56**:1129-1136.
- von Pirquet, C. 1906. *Allergie*. *Munch Med Wochenschr* **53**: 1457.
- Waisel, Y., & C. Geller-Bernstein. 1996. *Reliability of olive pollen extracts for skin prick tests*. *J Allergy Clin Immunol* **98**:715-716.
- Walker, J.D., C.L. Maier, & J.S. Pober. 2009. *Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes*. *J Immunol* **182**:1548-1559.
- Wallmann, J., M.M. Epstein, P. Singh, R. Brunner, K. Szalai, L. El-Housseiny, I. Pali-Scholl, & E. Jensen-Jarolim. 2010. *Mimotope vaccination for therapy of allergic asthma: anti-inflammatory effects in a mouse model*. *Clin Exp Allergy* **40**:650-658.
- Wan, H., H.L. Winton, C. Soeller, E.R. Tovey, D.C. Gruenert, P.J. Thompson, G.A. Stewart, G.W. Taylor, D.R. Garrod, M.B. Cannell, & C. Robinson. 1999. *Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions*. *J Clin Invest* **104**:123-133.
- Wan, Y.I., N.R. Shrine, M. Soler Artigas, L.V. Wain, J.D. Blakey, M.F. Moffatt, A. Bush, K.F. Chung, W.O. Cookson, D.P. Strachan, L. Heaney, B.A. Al-Momani, A.H. Mansur, S. Manney, N.C. Thomson, R. Chaudhuri, C.E. Brightling, M. Bafadhel, A. Singapuri, R. Niven, A. Simpson, J.W. Holloway, P.H. Howarth, J. Hui, A.W. Musk, A.L. James, M.A. Brown, S. Baltic, M.A. Ferreira, P.J. Thompson, M.D. Tobin, I. Sayers, & I.P. Hall. 2012. *Genome-wide association study to identify genetic determinants of severe asthma*. *Thorax* **67**:762-768.
- Wang, J.Y., C.C. Shieh, P.F. You, H.Y. Lei, & K.B. Reid. 1998. *Inhibitory effect of pulmonary surfactant proteins A and D on allergen-induced lymphocyte proliferation and histamine release in children with asthma*. *Am J Respir Crit Care Med* **158**:510-518.
- Wang, N.M., M.F. Lee, & C.H. Wu. 1999. *Immunologic characterization of a recombinant American cockroach (Periplaneta americana) Per a 1 (Cr-P11) allergen*. *Allergy* **54**:119-127.
- Wang, B., S.H. Hsu, S. Majumder, H. Kutay, W. Huang, S.T. Jacob, & K. Ghoshal. 2010a. *TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3*. *Oncogene* **29**:1787-1797.
- Wang, G., X. Zhou, Y. Bai, Z. Zhang, & D. Zhao. 2010b. *Cellular prion protein released on exosomes from macrophages binds to Hsp70*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**:345-350.
- Wang, J., Y. Ding, S. Hillmer, Y. Miao, S.W. Lo, X. Wang, D.G. Robinson, & L. Jiang. 2010c. *EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in Arabidopsis and tobacco cells*. *Plant Cell* **22**:4009-4030.
- Weber, K., & M. Osborn. 1969. *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. *J Biol Chem* **244**:4406-4412.
- Weber, R.W. 2004. *Cross-reactivity of pollen allergens*. *Curr Allergy Asthma Rep* **4**:401-408.
- Weckbach, L.T., L. Groesser, J. Borgolte, J.I. Pagel, F. Pogoda, J. Schymeinsky, J. Müller-Hocker, M. Shakibaei, T. Muramatsu, E. Deindl, & B. Walzog. 2012. *Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**:H429-438.
- Wehrle-Haller, B. 2012. *Structure and function of focal adhesions*. *Curr Opin Cell Biol* **24**:116-124.
- Weidinger, S., M. O'Sullivan, T. Illig, H. Baurecht, M. Depner, E. Rodríguez, A. Ruether, N. Klopp, C. Vogelberg, S.K. Weiland, W.H. McLean, E. von Mutius, A.D. Irvine, & M. Kabesch. 2008. *Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children*. *J Allergy Clin Immunol* **121**:1203-1209 e1201.

- Weiner, H.L. 2000. *Oral tolerance, an active immunologic process mediated by multiple mechanisms*. J Clin Invest **106**:935-937.
- Weiner, H.L. 2001. *Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells*. Microbes Infect **3**:947-954.
- Weiss, R., S. Scheiblhofer, J. Freund, F. Ferreira, I. Livey, & J. Thalhamer. 2002. *Gene gun bombardment with gold particles displays a particular Th2-promoting signal that over-rules the Th1-inducing effect of immunostimulatory CpG motifs in DNA vaccines*. Vaccine **20**:3148-3154.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman, & C.J. Der. 2005. *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci **118**:843-846.
- Wheeler, A.W., B.E. Hickman, & B. Fox. 1990. *Heterogeneity of a major allergen from olive (*Olea europaea*) pollen*. Mol Immunol **27**:631-636.
- Wheeler, A.W. 1992. *Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (*Olea europaea*)*. Clin Exp Allergy **22**:1052-1057.
- Whiterman, S.C., Yang, Y., J.M. Jones, & M. Spiteri. 2008. *FTIR spectroscopic analysis of sputum: preliminary findings on a potential novel diagnostic marker for COPD*. Ther Adv Respir Dis **2**:23-31.
- Wiedermann, U., B. Jahn-Schmid, R. Fritsch, L. Bauer, H. Renz, D. Kraft, & C. Ebner. 1998. *Effects of adjuvants on the immune response to allergens in a murine model of allergen inhalation: cholera toxin induces a Th1-like response to Bet v 1, the major birch pollen allergen*. Clin Exp Immunol **111**:144-151.
- Wiedermann, U., B. Jahn-Schmid, B. Bohle, A. Repa, H. Renz, D. Kraft, & C. Ebner. 1999a. *Suppression of antigen-specific T- and B-cell responses by intranasal or oral administration of recombinant bet v 1, the major birch pollen allergen, in a murine model of type I allergy*. J Allergy Clin Immunol **103**:1202-1210.
- Wiedermann, U., B. Jahn-Schmid, M. Lindblad, C. Rask, J. Holmgren, D. Kraft, & C. Ebner. 1999b. *Suppressive versus stimulatory effects of allergen/cholera toxoid (CTB) conjugates depending on the nature of the allergen in a murine model of type I allergy*. Int Immunol **11**:1717-1724.
- Wiedermann, U., U. Herz, K. Baier, S. Vrtala, U. Neuhaus-Steinmetz, B. Bohle, G. Dekan, H. Renz, C. Ebner, R. Valenta, & D. Kraft. 2001. *Intranasal treatment with a recombinant hypoallergenic derivative of the major birch pollen allergen Bet v 1 prevents allergic sensitization and airway inflammation in mice*. Int Arch Allergy Immunol **126**:68-77.
- Wiedermann, U. 2003. *Mucosal immunity-mucosal tolerance. A strategy for treatment of allergic diseases*. Chem Immunol Allergy **82**:11-24.
- Wiedermann, U. 2005. *Prophylaxis and therapy of allergy by mucosal tolerance induction with recombinant allergens or allergen constructs*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy **4**:577-583.
- Wilson, D.R., M.T. Lima, & S.R. Durham. 2005. *Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis*. Allergy **60**:4-12.
- Williams, A.P., M.T. Krishna, & A.J. Frew. 2004. *The safety of immunotherapy*. Clin Exp Allergy **34**:513-514.
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, T.Y. Neben, C.L. Karp, & D.D. Donaldson. 1998. *Interleukin-13: central mediator of allergic asthma*. Science **282**:2258-2261.
- Witke, W. 2004. *The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes*. Trends Cell Biol **14**:461-469.
- Wolf, D.A., C. Zhou, & S. Wee. 2003. *The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases?* Nat Cell Biol **5**:1029-1033.

- Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Théry, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Fauré, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, & L. Zitvogel. 2001. *Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming*. *Nat Med* **7**:297-303.
- Wong, K., X.R. Ren, Y.Z. Huang, Y. Xie, G. Liu, H. Saito, H. Tang, L. Wen, S.M. Brady-Kalnay, L. Mei, J.Y. Wu, W.C. Xiong, & Y. Rao. 2001. *Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway*. *Cell* **107**:209-221.
- Woodruff, P.G., H.A. Boushey, G.M. Dolganov, C.S. Barker, Y.H. Yang, S. Donnelly, A. Ellwanger, S.S. Sidhu, T.P. Dao-Pick, C. Pantoja, D.J. Erle, K.R. Yamamoto, & J.V. Fahy. 2007. *Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:15858-15863.
- Wopfner, N., O. Dissertori, F. Ferreira, & P. Lackner. 2007. *Calcium-binding proteins and their role in allergic diseases*. *Immunol Allergy Clin North Am* **27**:29-44.
- Wu, H.Y., F.J. Ward, & N.A. Staines. 2002. *Histone peptide-induced nasal tolerance: suppression of murine lupus*. *J Immunol* **169**:1126-1134.
- Wu, J., M. Kobayashi, E.A. Sousa, W. Liu, J. Cai, S.J. Goldman, A.J. Dorner, S.J. Projan, M.S. Kavuru, Y. Qiu, & M.J. Thomassen. 2005. *Differential proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid in asthmatics following segmental antigen challenge*. *Mol Cell Proteomics* **4**:1251-1264.
- Wu, F., M. Zikusoka, A. Trindade, T. Dassopoulos, M.L. Harris, T.M. Bayless, S.R. Brant, S. Chakravarti, & J.H. Kwon. 2008. *MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha*. *Gastroenterology* **135**:1624-1635 e1624.
- Wubbolts, R., R.S. Leckie, P.T. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Mobius, J. Hoernschemeyer, J.W. Slot, H.J. Geuze, & W. Stoorvogel. 2003. *Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation*. *J Biol Chem* **278**:10963-10972.
- Wurdinger, T., N.N. Gatsen, L. Balaj, B. Kaur, X.O. Breakefield, & D.M. Pegtel. 2012. *Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways*. *Adv Virol* **2012**:767694.
- Wyman, M. 1872. *Autumnal catarrh (hay fever)*. New York. Ed. Hurd & Houghton.
- Xie, T., J. Liang, N. Liu, Q. Wang, Y. Li, P.W. Noble, & D. Jiang. 2012. *MicroRNA-127 inhibits lung inflammation by targeting IgG Fcγ receptor I*. *J Immunol* **188**:2437-2444.
- Xu, H., K.W. Lee, & M. Goldfarb. 1998. *Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adapter proteins*. *J Biol Chem* **273**:17987-17990.
- Yamakuchi, M., S. Yagi, T. Ito, & C.J. Lowenstein. 2011. *MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells*. *PLoS One* **6**:e20291.
- Yamamoto, Y., Y. Yoshioka, K. Minoura, R.U. Takahashi, F. Takeshita, T. Taya, R. Horii, Y. Fukuoka, T. Kato, N. Kosaka, & T. Ochiya. 2011. *An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human breast cancer cells*. *Mol Cancer* **10**:135.
- Yang, C., & P.D. Robbins. 2012. *Immunosuppressive exosomes: a new approach for treating arthritis*. *Int J Rheumatol* **2012**:573528.
- Yao, G., M. Yin, J. Lian, H. Tian, L. Liu, X. Li, & F. Sun. 2010. *MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor-beta-mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad4*. *Mol Endocrinol* **24**:540-551.
- Yarden, Y., & M.X. Sliwkowski. 2001. *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:127-137.

- Yoon, M., R.D. Moir, V. Prahlad, & R.D. Goldman. 1998. *Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells*. J Cell Biol **143**:147-157.
- Yoshimura, A. 2009. *Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins*. The Keio journal of medicine **58**:73-83.
- Young, J.M., & B.J. Trask. 2002. *The sense of smell: genomics of vertebrate odorant receptors*. Hum Mol Genet **11**:1153-1160.
- Yu, X., S.L. Harris, & A.J. Levine. 2006. *The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein*. Cancer Res **66**:4795-4801.
- Yu, H., S.H. Venkatesha, & K.D. Moudgil. 2012. *Microarray-based gene expression profiling reveals the mediators and pathways involved in the anti-arthritis activity of Celastrus-derived Celastrol*. Int Immunopharmacol **13**:499-506.
- Zaman, G.J. 1993. *Sequence of a cDNA encoding human ribosomal protein L26 and of a cDNA probably encoding human ribosomal protein L6*. Nucleic Acids Res **21**:1673.
- Zanger, U.M., & M. Schwab. 2013. *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. Pharmacology & therapeutics (in press).
- Zasloff, M. 2002. *Antimicrobial peptides in health and disease*. N Engl J Med **347**:1199-1200.
- Zerial, M., & H. McBride. 2001. *Rab proteins as membrane organizers*. Nat Rev Mol Cell Biol **2**:107-117.
- Zhang, H.G., C. Liu, K. Su, S. Yu, L. Zhang, S. Zhang, J. Wang, X. Cao, W. Grizzle, & R.P. Kimberly. 2006. *A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death*. J Immunol **176**:7385-7393.
- Zhang, N., X. Li, C.W. Wu, Y. Dong, M. Cai, M.T. Mok, H. Wang, J. Chen, S.S. Ng, M. Chen, J.J. Sung, & J. Yu. 2012a. *microRNA-7 is a novel inhibitor of YY1 contributing to colorectal tumorigenesis*. Oncogene
- Zhang, Y., S. Takahashi, A. Tasaka, T. Yoshima, H. Ochi, & K. Chayama. 2012b. *Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol Hepatol
- Zheng, Y., S.L. Collins, M.A. Lutz, A.N. Allen, T.P. Kole, P.E. Zarek, & J.D. Powell. 2007. *A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy*. J Immunol **178**:2163-2170.
- Zheng, J., H.Y. Jiang, J. Li, H.C. Tang, X.M. Zhang, X.R. Wang, J.T. Du, H.B. Li, & G. Xu. 2012. *MicroRNA-23b promotes tolerogenic properties of dendritic cells in vitro through inhibiting Notch1/NF-kappaB signalling pathways*. Allergy **67**:362-370.
- Zhong, H., H.R. Wang, S. Yang, J.H. Zhong, T. Wang, C. Wang, & F.Y. Chen. 2010. *Targeting Smad4 links microRNA-146a to the TGF-beta pathway during retinoid acid induction in acute promyelocytic leukemia cell line*. Int J Hematol **92**:129-135.
- Zhou, G., L.A. Dada, & J.I. Sznajder. 2008. *Regulation of alveolar epithelial function by hypoxia*. Eur Respir J **31**:1107-1113.
- Zienkiewicz, K., A.J. Castro, J.D. Alché, A. Zienkiewicz, C. Suarez, & M.I. Rodríguez-García. 2010. *Identification and localization of a caleosin in olive (Olea europaea L.) pollen during in vitro germination*. J Exp Bot **61**:1537-1546.
- Zimmermann, B. 2010. *Characterization of pollen by vibrational spectroscopy*. Appl Spectrosc **64**:1364-1373.

- Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, & S. Amigorena. 1998. *Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes*. *Nat Med* **4**:594-600.
- Zonia, L. 2010. *Spatial and temporal integration of signalling networks regulating pollen tube growth*. *J Exp Bot* **61**:1939-1957.
- Zonia, L., & T. Munnik. 2011. *Understanding pollen tube growth: the hydrodynamic model versus the cell wall model*. *Trends Plant Sci* **16**:347-352.
- Zoss, A.R., C.A. Koch, & R.S. Hirose. 1937. *Alum-ragweed precipitate: preparation and clinical investigation: preliminary report*. *J Allergy* **8**:609-619.
- Zou, J., Zhan, X., Wu, H., H. Wang, & A.Y. Cheung. 1994. *Characterization of a rice pollen-specific gene and its expression*. *Am J Botany* **81**: 552-561.

APÉNDICES

ABREVIATURAS

- **3'-UTR** Región genómica 3'-no codificante, del inglés *3'-Untranslated Región*.
- **aa** Aminoácido.
- **Ab** Anticuerpo (en el artículo 2), del inglés *Antibody*.
- **ACTB** Actina citoplasmática 1, del inglés *Actin, Cytoplasmic 1*.
- **ACTG1** Actina citoplasmática 2, del inglés *Actin, Cytoplasmic 2*.
- **Actr1a** α -centractina, del inglés *ARP1 Actin-Related Protein 1 Homolog A, Centractin Alpha*.

- **ADAM-8** Del inglés *A Disintegrin and Metalloprotease Domain 8*.
- **Ag** Antígeno (en el artículo 1), del inglés *Antigen*.
- **Akt** Serín/treonín-quinasa del inglés, *Serine/Threonine Kinase*.
- **Alum** Hidróxido de aluminio. $\text{Al}(\text{OH})_3$
- **ALDH** Aldehído deshidrogenasa.
- **Alexa 488** Ester del ácido tetrafluorofenil carboxílico.
- **APC** Célula presentadora de antígeno, del inglés *Antigen Presenting Cell*.
- **Arhgef12** Factor intercambiador de nucleótidos de guanina 12 de Rho, del inglés *Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 12*.

- **BALF** Fluido broncoalveolar, del inglés *Bronchoalveolar Lavage Fluid*.
- **BCR** Receptor de las células B, del inglés *B-Cell Receptor*.
- **Bet v 1** Alérgeno principal del polen de abedul (*Betula verrucosa*).
- **BSA** Albúmina de suero bovino, del inglés *Bovine Serum Albumin*.
- **CCL** Ligandos de receptores de quimioquinas Cys-Cys, del inglés *Chemokine Cys-Cys Motif Ligand*.

- **CLSM** Microscopía láser confocal, del inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*.
- **Con A** Concanavalina A.
- **c.p.m.** Cuentas por minuto.
- **cRNA** RNA complementario.
- **CTLA-4** Antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos, del inglés *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*.

- **CXCL** Ligandos de receptores de quimioquinas Cys-X-Cys, del inglés *Chemokine Cys-X-Cys Motif Ligand*.

- **DC** Célula dendrítica, del inglés *Dendritic Cell*.
- **Dex** Exosomas derivados de células dendríticas.
- **DIANA** Del inglés *DNA Intelligent Analysis*.
- **DO** Densidad óptica. En los artículos se empleó **OD**, del inglés *Optical Density*.
- **EBV** Virus de Epstein-Barr, del inglés *Epstein-Barr Virus*.
- **ECL** Reactivo quimioluminiscente para la detección de la HRP, del inglés *Enhanced Chemiluminescent*.

- **EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic Acid*.
- **EGF** Factor de crecimiento epidérmico, del inglés *Epidermal Growth Factor*.
- **ELISA** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*.
- **ESCRT** Complejo de clasificación endosomal requeridos para el transporte, del inglés *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*.
- **Exo_{Ale}** Exosomas aislados del BALF de ratones sensibilizados a Ole e 1.
- **Exo_{Con}** Exosomas aislados del BALF de ratones *naïve*.
- **Exo_{Tol}** Exosomas aislados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1.
- **EXPOs** Orgánulos positivos a exocistos, del inglés *Exocyst-Positive Organelles*.
- **FACS** Citometría de flujo, del inglés *Fluorescence Activated Cell Sorting*.
- **FAK** Quinasa de adhesiones focales, del inglés *Focal Adhesion Kinase*.
- **FcεRI** Receptor de la fracción constante (Fc) de IgE de alta afinidad.
- **FcεRII** Receptores de la fracción constante (Fc) de IgE de baja afinidad.
- **FCS** Suero fetal bovino, del inglés *Fetal Calf Serum*.
- **FI** Filamentos intermedios.
- **FITC** Isotiocianato de fluoresceína, del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*.
- **FT** Factores de transcripción.
- **FTIR** Espectroscopía de infrarrojos mediante transformada de Fourier, del inglés *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*.
- **GAM** Anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón, del inglés *Goat Anti-Mouse*.
- **GAR** Anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo, del inglés *Goat Anti-Rabbit*.
- **GM-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*.
- **GO** Ontología Genética, del inglés *Gene Ontology*.
- **gp96** Glicoproteína 96.
- **HLA** Antígeno de histocompatibilidad de leucocitos humanos, del inglés *Human Leukocyte Antigen*.
- **HPLC-MS/MS** Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas, del inglés *High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*.
- **HRP** Peroxidasa de rábano, del inglés *Horseradish Peroxidase*.
- **hsp** Proteína de choque térmico, del inglés *Heat Shock Protein*.
- **H&E** Hematoxilina-eosina, del inglés *Hematoxylin & Eosin*.
- **ICAM-1** Molécula de adhesión intercelular 1, del inglés *Intercellular Cell-Adhesion Molecule 1*.
- **IFN** Interferón.
- **IFR** Isoflavona reductasa, del inglés *Isoflavone Reductase*.
- **Ig** Inmunoglobulina.

• IL	Interleuquina.
• ILVs	Vesículas intraluminales, del inglés <i>Intraluminal Vesicles</i> .
• i.n.	Intranasal.
• i.p.	Intraperitoneal.
• JIM7	Anticuerpo monoclonal anti-pectina desesterificada producido en rata.
• kDa	Kilodalton.
• KEGG	Del inglés <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> .
• LPS	Lipopolisacárido.
• MALT	Tejido linfoide asociado a mucosa, del inglés <i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i> .
• MFGE-8	Lactaderina, del inglés <i>Milk Fat Globule-EGF Factor 8</i> .
• MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i> .
• miRNA/miR	microRNA.
• MM	Masa molecular.
• MREs	Elementos de reconocimiento de microRNA, del inglés <i>microRNA Recognition Elements</i> .
• mRNA	RNA mensajero.
• mTOR	Diana de la rapamicina en mamíferos, del inglés <i>Mammalian Target of Rapamycin</i> .
• MS	Espectrometría de masas, del inglés <i>Mass Spectrometry</i> .
• MVBs	Cuerpos multivesiculares, del inglés <i>Multivesicular Bodies</i> .
• nt	Nucleótido.
• NVS	Nanovesículas de secreción.
• Ole e 1	Alérgeno principal del polen de olivo (<i>Olea europaea</i>).
• OlfR	Receptor olfatorio, del inglés <i>Olfactory Receptor</i> .
• OVA	Ovoalbúmina, alérgeno del huevo.
• PAGE-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico, del inglés <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate</i> .
• Partículas-P	Partículas de polisacáridos.
• PAS	Ácido periódico-reactivo de Schiff, del inglés <i>Periodic Acid-Schiff</i> .
• PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> .
• PBS-T	Tampón fosfato salino con Tween 20, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline-Tween 20</i> .
• PCBER	Del inglés <i>Phenylcoumaran Benzylic Ether Reductase</i> .
• PE	Ficoeritrina, del inglés <i>Phycoerythrin</i> .
• pI	Punto isoeléctrico.
• PI3K	Fosfatidil inositol-3-fosfato-quinasa, del inglés <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> .
• PME	Pectin metilesterasa.

- **PR** Proteínas relacionadas con patogénesis de plantas, del inglés *Plant Pathogenesis Related Proteins*.
- **RAM** Anticuerpo de rata anti-IgG de ratón, del inglés *Rat Anti-Mouse*.
- **rRNA** RNA ribosomal.
- **RT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, del inglés *Real-Time Polymerase Chain Reaction*.
- **SCIT** Inmunoterapia específica subcutánea, del inglés *Subcutaneous Immunotherapy*.
- **SD** Desviación estándar, del inglés *Standard Deviation*.
- **SEM** a) Microscopía electrónica de barrido, del inglés *Scanning Electron Microscopy*.
b) Error estándar, del inglés *Standard Error of the Mean*.
- **SIT** Inmunoterapia específica, del inglés *Specific Immunotherapy*.
- **SLIT** Inmunoterapia específica sublingual, del inglés *Sublingual Immunotherapy*.
- **SNAREs** Receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible a N-etilmaleimida, del inglés *Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor Activating Protein Receptor*.
- **SP-A/B/C/D** Proteínas del surfactante pulmonar A, B, C y D, del inglés *Surfactant Protein-A, -B, -C, and -D*.
- **SPPs** Partículas subpolínicas, del inglés *Subpollen Particles*.
- **Spred2** Del inglés *Sprouty-related, EVH1 domain containing 2*.
- **sRNA** RNA de pequeño tamaño, del inglés *Small RNA*.
- **ST** Estreptavidina, del inglés *Streptavidin*.
- **STRING** Del inglés *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*.
- **TBS** Tampón Tris salino, del inglés *Tris-Buffered Saline*.
- **TBS-T** Tampón Tris salino con Tween 20, del inglés *Tris-Buffered Saline-Tween 20*.
- **TCR** Receptor de células T, del inglés *T-Cell Receptor*.
- **TCS** Puntuación contextualizada del sitio, del inglés *Total Context Score*.
- **TEM** Microscopía electrónica de transmisión, del inglés *Transmission Electron Microscopy*. En el primer artículo se emplea EM, del inglés *Electron Microscopy*.
- **TGF** Factor de crecimiento transformante, del inglés *Transforming Growth Factor*.
- **Th** Célula T colaboradora, del inglés *Helper T Cell*.
- **TLR** Receptor tipo *Toll*, del inglés *Toll-like Receptor*.
- **TNF** Factor de necrosis tumoral, del inglés *Tumor Necrosis Factor*.
- **Treg** Célula T reguladora, del inglés *Regulatory T cell*.
- **Triton X-100** Octilfenol etoxilato.
- **tRNA** RNA de transferencia.
- **Tsg101** Proteína celular tumoral humana susceptible al gen 101, del inglés *Tumor Susceptibility Gene 101 Protein*.
- **TSLP** Linfopoietina estromal tímica, del inglés *Thymic Stromal Lymphopoietin*.
- **Tween 20** Monolaurato de polioxietilensorbitano. En las soluciones de uso general también aparece abreviado como **T**.

- **VIH** Virus de la inmunodeficiencia humana.
- **Vmn1/2r** Receptores vomeronasales 1 y 2, del inglés *Vomeronasal 1/2 Receptors*.
- **VNO** Órgano vomeronasal, del inglés *Vomeronasal Organ*.
- **VSR** Receptor del *sorting* vacuolar, del inglés *Vacuolar Sorting Receptor*.

Nota aclaratoria: Para agilizar la lectura de la tesis, las definiciones en inglés se incluyeron exclusivamente en el apartado de Resultados y Discusión concerniente a los estudios proteómicos y transcriptómicos. En la lista sólo figuran los genes candidato expresados diferencialmente.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de la reacción alérgica.	4
Figura 2. Tríada básica para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.	6
Figura 3. Mecanismo propuesto para la inmunoterapia específica.	11
Figura 4. Representación esquemática de la biogénesis y secreción de los tres tipos principales de microvesículas.	21
Figura 5. Representación esquemática de la composición molecular de un exosoma “canónico”.	23
Figura 6. El olivo (<i>Olea europaea</i>) y su cultivo.	28
Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido del grano del polen de olivo.	29
Figura 8. Diseño del protocolo experimental de inducción de tolerancia para el aislamiento de Exo _{Tol} .	39
Figura 9. Diseño del protocolo experimental de sensibilización alérgica para el aislamiento de Exo _{Ale} .	39
Figura 10. Diseño del protocolo experimental del tratamiento profiláctico, a <i>Corto</i> y <i>Largo plazo</i> basado en la administración i.n. de Exo _{Tol} .	48
Figura 11. Diseño del protocolo experimental del tratamiento “bystander” basado en la administración i.n. de Exo _{Tol} .	48
Figura 12. Diseño experimental de los protocolos de sensibilización con Exo _{Ale} .	49
Figura 13. Depósito del aerosol atmosférico en las vías aéreas en función del tamaño de la partícula.	56
Figura 14 (Figure 1, Article 1). BALF-derived exosomes from tolerized mice are similar to those derived from naive mice.	65
Figura 15 (Figure 2, Article 1). BALF-derived Exo _{Tol} inhibit synthesis of IgE and induce IgG2a in a mouse model of allergic sensitization.	65
Figura 16 (Figure 3, Article 1). T cell reactivity to Ole e 1 in spleen cell cultures from mice pretreated with Exo _{Tol} .	66
Figura 17 (Figure 4, Article 1). Exo _{Tol} pretreatment inhibits airway inflammation.	66
Figura 18 (Figure 5, Article 1). Exo _{Tol} pretreatment induces long-lasting protection against Ole e 1 sensitization.	67
Figura 19. Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 en los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos presentes en el suero.	72
Figura 20. Efecto de la administración i.n. de Ole e 1 sobre la proliferación de las células T específicas de bazo.	72
Figura 21. Efecto del tratamiento i.n. con Ole e 1 en la respuesta inflamatoria de las vías aéreas inferiores.	73

Figura 22. Efecto de la administración i.n. de Exo _{Con} en los niveles séricos de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos.	76
Figura 23. Efecto de la administración i.n. de Exo _{Con} en la respuesta de las células T específicas de bazo.	77
Figura 24. Efecto de la administración i.n. de Exo _{Con} en la respuesta inflamatoria de las vías aéreas inferiores.	78
Figura 25 (Figure 1, Article 2). Exo _{Tol} pretreatment induces bystander protection against Bet v 1-sensitization.	84
Figura 26. Estudio comparativo mediante espectroscopía FTIR de los Exo _{Con} y Exo _{Tol} .	88
Figura 27. Análisis comparativo del contenido proteico de los exosomas derivados del BALF mediante PAGE-SDS y tinción con <i>Bio-Safe Coomassie Stain</i> .	90
Figura 28. Clasificación de las proteínas de los exosomas derivados del BALF según la terminología GO.	92
Figura 29. Red de interacción entre las proteínas identificadas en los exosomas derivados del BALF.	100
Figura 30. Electroferogramas de RNA total aislado a partir de los exosomas derivados del BALF de ratón.	105
Figura 31. Estrategia de trabajo para el estudio de la expresión diferencial entre los Exo _{Tol} y Exo _{Con} , mediante <i>microarrays</i> de DNA.	106
Figura 32. Red de interacción entre los genes expresados diferencialmente en los Exo _{Tol} .	117
Figura 33. Mapa de <i>clustering</i> jerárquico del análisis funcional de los miRNAs expresados diferencialmente en los Exo _{Tol} .	128
Figura 34. Vía de señalización TGF- β .	129
Figura 35. Vía de señalización mTOR.	131
Figura 36. Vía de señalización ErbB.	132
Figura 37. Vía de señalización FAK (<i>Focal adhesion kinase</i>).	133
Figura 38. Vía de señalización en guía del axón.	134
Figura 39. Esquema representativo de la composición molecular de los exosomas derivados del BALF de ratones.	138
Figura 40. Caracterización de los exosomas derivados del BALF de ratones sensibilizados a Ole e 1.	140
Figura 41. Estudio comparativo mediante espectroscopía FTIR de los Exo _{Con} y Exo _{Ale} .	141
Figura 42. Efecto de la administración i.n. de Exo _{Ale} en los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos presentes en suero.	142

Figura 43. Efecto de la administración i.n. de Exo _{Ale} en la respuesta de las células T específicas de bazo.	142
Figura 44. Efecto de la administración i.n. de Exo _{Ale} en la respuesta inflamatoria de las vías aéreas inferiores.	144
Figura 45. Efecto de la administración de Exo _{Ale} en los niveles de mRNA de ADAM-8 y de CCL11, en pulmón y bazo.	145
Figura 46. Efecto de la administración i.n. de Exo _{Ale} durante la sensibilización en los niveles de anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a específicos presentes en suero.	146
Figura 47. Efecto de la administración vía i.n. de Exo _{Ale} durante la etapa de sensibilización en la respuesta de las células T específicas de bazo.	147
Figura 48. Caracterización de las nanovesículas liberadas por el grano de polen de olivo durante la germinación <i>in vitro</i> .	150
Figura 49. Espectro FTIR de los polensomas de olivo.	151
Figura 50. Determinación de la presencia de pectinas esterificadas en los polensomas de olivo.	152
Figura 51. Análisis comparativo del contenido proteico de los polensomas mediante PAGE-SDS al 15% y tinción con azul de Coomassie.	153
Figura 52. <i>Western blot</i> de los alérgenos Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 9, Ole e 11 y Ole e 12 en los polensomas de olivo, empleando anticuerpos específicos.	160
Figura 53. Localización en los polensomas de los alérgenos Ole e 1, Ole e 11 y Ole e 12 tras ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.	161
Figura 54. Inmunolocalización de Ole e 1 y Ole e 12 en los polensomas mediante TEM, empleando anticuerpos específicos.	162
Figura 55. Inmunolocalización de Ole e 12 mediante TEM en el grano de polen maduro y germinado.	163
Figura 56. Inmunolocalización de Ole e 12 mediante CLSM en los granos de polen maduro y germinado.	165
Figura 57. Estudio de la cinética de liberación de los polensomas <i>in vitro</i> .	168
Figura 58. Reactividad de las proteínas que unen IgE en los polensomas, analizada mediante <i>Western blot</i> con sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo.	169
Figura 59. Curvas de dosis-respuesta de la desgranulación de basófilos de pacientes alérgicos al polen de olivo inducidas por los polensomas.	170
Figura 60. Caracterización de los polensomas secretados por los granos de polen de especies no relacionadas filogenéticamente con el olivo.	172
Figura 61. Análisis mediante SEM de los filtros aerobiológicos	175
Figura 62. Análisis de los polensomas aislados de los filtros aerobiológicos correspondientes al estadio-F del impactador de cascada Andersen.	175

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Hitos históricos en el conocimiento de la alergia.	2
Tabla 2. Papel de los diferentes subtipos de células T CD4 ⁺ en la alergia.	6
Tabla 3. Fármacos empleados para el tratamiento de las enfermedades alérgicas.	8
Tabla 4. Principales avances en la inmunoterapia específica.	9
Tabla 5. Principales subtipos de células T CD4 ⁺ reguladoras (Treg).	12
Tabla 6. Estudios clínicos empleando nuevas estrategias de vacunación.	13
Tabla 7. Resumen de los principales estudios preclínicos empleando nuevas estrategias de vacunación.	14
Tabla 8. Características físico-químicas de los principales tipos de microvesículas secretadas.	18
Tabla 9. Alérgenos del polen de olivo descritos	31
Tabla 10. Anticuerpos utilizados para la caracterización de los exosomas del BALF.	42
Tabla 11. Anticuerpos utilizados para la caracterización de los exosomas mediante citometría de flujo.	43
Tabla 12. Secuencia y características de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de RT-PCR.	52
Tabla 13. Asignación de las bandas de absorción de FTIR de los exosomas.	88
Tabla 14. Proteínas identificadas en los Exo _{Con} y Exo _{Tol} mediante digestión trípica en gel seguida de HPLC-MS/MS.	91
Tabla 15. Proteínas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas exclusivamente en los exosomas control.	95
Tabla 16. Proteínas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas exclusivamente en los exosomas tolerogénicos.	96
Tabla 17. Proteínas identificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en ambos tipos de exosomas.	98
Tabla 18. Genes sobreexpresados en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, identificados mediante <i>microarrays</i> de DNA.	108
Tabla 19. Genes reprimidos en los exosomas derivados del BALF de ratones tolerantes a Ole e 1, identificados mediante <i>microarrays</i> de DNA.	111
Tabla 20. miRNAs expresados diferencialmente en los exosomas tolerogénicos derivados del BALF.	121

Tabla 21. miRNAs y sus potenciales mRNAs dianas en la serie de genes diferencialmente expresados en Exo _{Tol} derivados del BALF de ratón.	125
Tabla 22. miRNAs y sus potenciales mRNAs dianas en la serie de proteínas identificadas en los exosomas derivados del BALF de ratón.	126
Tabla 23. Proteínas identificadas mediante HPLC-MS/MS y secuenciación <i>de novo</i> en los polensomas de olivo.	156
Tabla 24. Pruebas cutáneas con polensomas y extracto de polen, en pacientes alérgicos al polen de olivo.	170
Tabla 25. Recuento diario de pólenes en la ciudad de Granada, correspondientes al periodo de muestreo del año 2010.	174

